

Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A.C.

“ASOCIACIÓN ARABINOXILANO-PROTEÍNA Y EFECTO  
DE LA FRACCIÓN PROTEICA EN LA CAPACIDAD  
GELIFICANTE DEL POLISACÁRIDO”

---

Por

Mayra Alejandra Méndez Encinas

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

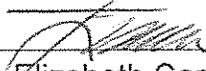
MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2015

## APROBACIÓN

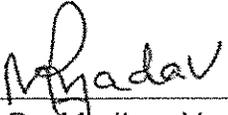
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Mayra Alejandra Méndez Encinas la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

  
Dra. Elizabeth Carvajal Millán  
Directora de Tesis

  
Dr. Jaime Lizardi Mendoza  
Asesor

  
Dra. Yolanda Leticia López Franco  
Asesor

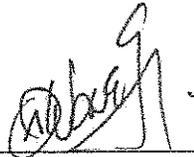
  
Dr. Agustín Rascón Chu  
Asesor

  
Dr. Madhav Yadav  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindarme el apoyo económico para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por darme la oportunidad de ser parte de su programa de posgrado.

Al proyecto CONACyT-SALUD 2012-01-179746: "Desarrollo de matrices de arabinosidos ferulados como sistemas para la liberación controlada de insulina".

A mi directora de tesis, la Dra. Elizabeth Carvajal Millán. Gracias por su confianza al recibirme como su estudiante y compartirme su conocimiento y experiencia. Por todo el apoyo y paciencia durante la realización de este trabajo y por otorgarme su tiempo siempre que lo necesité a pesar de sus múltiples ocupaciones.

A los miembros de mi comité, Dra. Yolanda Leticia López Franco, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, Dr. Agustín Rascón Chu y Dr. Madhav Yadav por su tiempo y valiosas aportaciones para lograr este gran trabajo.

A la M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson y la M.C. Alma Rosa Toledo Guillén por su paciencia, tiempo y apoyo en el trabajo de laboratorio.

A la Q.B. Alma Consuelo Campa Mada, por el apoyo técnico brindado en el laboratorio y por compartir conmigo buenos momentos. Muchas gracias por su amistad y por ser su chipilona.

A la Dra. Elisa Mirian Valenzuela Soto y la M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto, por permitirme trabajar en su laboratorio; gracias por su tiempo y asesoría. Al M.C. Orlando Tortoledo Ortiz y la M.C. Guillermina García Sánchez, por el apoyo en la realización de los análisis del perfil de aminoácidos.

Al Dr. Madhav Yadav y al Dr. Alberto Núñez del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) por recibirme en su laboratorio; gracias por hacerme sentir como en casa durante mi estancia. A Joe Uknalis y Stefanie Simon, por su asistencia técnica durante mi trabajo de laboratorio en la USDA.

A mis compañeros de laboratorio: Rita Paz, Ana Luisa Martínez, Jorge Márquez, Gonzalo Santos, Karla Saborit, José Miguel Fierro, Ana María Morales, Esmeralda Valenzuela, Diana Fimbres, Daniel Miramón y Javier Caro, por compartir conmigo esta gran meta profesional. Por sus consejos, apoyo y momentos agradables.

Agradezco especialmente a mi familia, que nunca ha dejado de apoyarme y creer en mí. Por impulsarme a seguir adelante, a superarme y desarrollarme profesionalmente. Muchas gracias por sus consejos y porque siempre están ahí para mí.

Agradezco a mi esposo Mario Andrés Salcedo, que me acompañó durante el trayecto de esta meta profesional. Gracias por siempre alentarme a seguir adelante, a no rendirme y siempre dar lo mejor de mí. Por tus palabras de aliento y porque siempre estuviste ahí para escucharme.

A Dios, que nunca me abandona y me da fuerzas para seguir adelante cada día.

## DEDICATORIA

A mis padres, mi hermana y esposo, que son mi ejemplo a seguir. Porque siempre me han aconsejado y guiado, y me han enseñado a valorar la vida. Sin su amor y apoyo no hubiera sido posible este logro, el cual hoy comparto con ustedes. Gracias por estar siempre a mi lado y darme de más.

## CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE CUADROS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....	3
II.1. Estructura Química de los Arabinosilanos .....	3
II.2. Asociación Arabinosilano-Proteína .....	5
II.3. Características Fisicoquímicas de los Arabinosilanos .....	9
II.3.1. Peso Molecular .....	10
II.3.2. Solubilidad .....	10
II.3.3. Viscosidad .....	11
II.4. Capacidad Gelificante de los Arabinosilanos.....	11
II.5. Asociación AX-Proteína y Gelificación.....	14
III. HIPÓTESIS .....	17
IV. OBJETIVOS.....	18
IV.1. General.....	18
IV.2. Particulares .....	18
V. CARACTERÍSTICAS VISCOELÁSTICAS Y MICROESTRUCTURALES DE GELES DE ARABINOSILANOS FERULADOS: EFECTO DE LA REMOCIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA ASOCIADA AL POLISACÁRIDO .....	19
V.1. Resumen.....	19
V.2. Introducción.....	20
V.3. Materiales y Métodos .....	22
V.3.1. Materiales .....	22
V.3.2. Métodos .....	22
V.3.2.1. Extracción de DDGAX de pericarpio de maíz. ....	22
V.3.2.2. Tratamiento con enzimas proteasas de DDGAX.....	22

## CONTENIDO (Continuación)

V.3.2.3. Proteína.....	23
V.3.2.4. Azúcares neutros.....	23
V.3.2.5. Cuantificación de AF en DDGAX y DDGAXP.....	23
V.3.2.6. Determinación de viscosidad intrínseca.....	24
V.3.2.7. Espectroscopía de Infrarojo Transformada de Fourier (FT-IR).....	24
V.3.2.8. Distribución de peso molecular.....	24
V.3.2.9. Diálisis de DDGAX.....	25
V.3.2.10. Gelificación de AX.....	25
V.3.2.11. Reología de baja deformación.....	25
V.3.2.12. Microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de geles y soluciones de DDGAX y DDGAXP.....	25
V.3.2.13. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los geles de DDGAX y DDGAXP liofilizados.....	26
V.3.2.14. Análisis Estadístico.....	26
V.4. Resultados y Discusión.....	27
V.4.1. Extracción y Caracterización de DDGAX.....	27
V.4.2. Tratamiento con Proteasas de DDGAX.....	28
V.4.3. Espectroscopía FT-IR.....	29
V.4.4. Distribución de Peso Molecular de DDGAX y DDGAXP.....	30
V.4.5. Gelificación de DDGAX y DDGAXP.....	31
V.4.6. Distribución de Peso Molecular de DDGAXD y DDGAXP.....	33
V.4.7. Características Viscoelásticas de DDGAXD y DDGAXP.....	34
V.4.8. Distribución de Proteína en Soluciones y Geles de DDGAX y DDGAXP.....	37
V.4.9. Estructura de Geles Liofilizados de DDGAX y DDGAXP.....	37
V.5. Conclusiones.....	40
<b>VI. ENLACE COVALENTE CARBOHIDRATO-AMINOÁCIDO EN LA ASOCIACIÓN ARABINOXILANO-PROTEÍNA.....</b>	<b>41</b>
VI.1. Resumen.....	41
VI.2. Introducción.....	42
VI.3. Materiales y Métodos.....	44
VI.3.1. Materiales.....	44
VI.3.2. Métodos.....	44
VI.3.2.1. Deglicosilación de DDGAX con ácido trifluorometanosulfónico (TFMS).....	44
VI.3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteína de DDGAX deglicosilada usando TFMS.....	45
VI.3.2.3. Digestión con enzima tripsina de proteína de DDGAX.....	45
VI.3.2.4. Espectrometría de masas.....	45
VI.3.2.5. Tratamiento con enzima O-glicosidasa de DDGAXD.....	46
VI.3.2.6. Composición de aminoácidos de DDGAXD.....	46
VI.3.2.7. Análisis Estadístico.....	47

## CONTENIDO (Continuación)

VI.4. Resultados y Discusión.....	48
VI.4.1. Deglicosilación de DDGAX usando TFMS y Electroforesis SDS-PAGE .	48
VI.4.2. Digestión de la Proteína de DDGAX con la Enzima Tripsina y Análisis de Espectrometría de Masas .....	48
VI.4.3. Deglicosilación de DDGAXD con Enzima O-glicosidasa y Electroforesis de proteína de DDGAXD.....	51
VI.4.4. Perfil de aminoácidos de la proteína asociada a DDGAXD .....	54
VI.5. Conclusiones .....	57
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	58

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Posición de arabinosas en arabinosilanos.....	3
Figura 2. Estructura propuesta para el dímero AF-Tyr. ....	8
Figura 3. Formación de la red tridimensional de AX por acción de la enzima lacasa. ....	12
Figura 4. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de DDGAX y DDGAXP. ....	30
Figura 5. Perfil de elución de exclusión molecular por HPLC de DDGAX y DDGAXP. ....	31
Figura 6. Cinética reológica de soluciones al 2% (p/v) de DDGAX y DDGAXP durante la gelificación inducida por lacasa. ....	32
Figura 7. Espectro mecánico de geles de DDGAX y DDGAXP al 2% (p/v). ...	33
Figura 8. Perfil de elución de exclusión molecular por HPLC de DDGAX, DDGAXD y DDGAXP. ....	34
Figura 9. Cinética reológica de soluciones al 2% (p/v) de DDGAXD y DDGAXP durante la gelificación inducida por lacasa. ....	36
Figura 10. Espectro mecánico de geles de DDGAXD y DDGAXP al 2% (p/v)..	36
Figura 11. Observaciones por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de DDGAX y DDGAXP en a) solución al 2% (p/v) y b) gel al 2% (p/v).....	38
Figura 12. Observaciones por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los geles liofilizados al 2% (p/v) de a) DDGAX y b) DDGAXP. ....	39
Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de proteína obtenida de DDGAX después de deglicosilación y de $\alpha$ -lactoalbúmina. ....	49

<b>Figura 14.</b> Espectro de masas MALDI TOF/TOF de péptidos de proteína de DDGAX digerida con tripsina.....	50
<b>Figura 15.</b> Espectro de fragmentación de ión precursor 848.3801.....	51
<b>Figura 16.</b> Electroforesis SDS-PAGE de proteína de DDGAXD obtenida después de la deglicosilación con O-glicosidasa.....	53
<b>Figura 17.</b> Esquema del sitio de corte de la enzima O-glicosidasa..	53
<b>Figura 18.</b> Estructura de AX de pericarpio de granos de cereales..	54

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
Cuadro 1.	Aminoácidos más abundantes en las proteínas asociadas a AX.....	7
Cuadro 2.	Composición de los DDGAX, DDGAXD y DDGAXP.....	28
Cuadro 3.	Contenido de aminoácidos de proteína de DDGAXD.....	56

## RESUMEN

Los arabinoxilanos (AX) son polisacáridos heterogéneos no amiláceos presentes en varios tejidos de cereales. Los AX tienen la capacidad de formar geles covalentes mediante el acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico (AF) por acción de un agente entrecruzante como la enzima lacasa. Las propiedades de los geles de AX dependen de las características estructurales del polisacárido. El contenido de proteína en AX es una de las características cuyo impacto en la gelificación del polisacárido no ha sido investigado a profundidad. El objetivo del presente estudio fue remover la proteína asociada al AX mediante tratamientos enzimáticos (proteasa, O-glicosidasa) para investigar el tipo de enlace AX-proteína y evaluar el efecto de esta modificación enzimática en las características viscoelásticas y microestructurales de los geles de AX formados. En una primera etapa de la investigación, los AX extraídos de granos secos de la destilería con solubles (DDGAX) fueron caracterizados. Estos presentaron una pureza del 64% (p/p), un peso molecular promedio de 209 kDa, un contenido de AF de 6.05 µg/mg AX, una proporción A/X de 1.08, una viscosidad intrínseca de 292 mL/g y un contenido de proteína de 8.2%. El tratamiento con proteasas de DDGAX redujo el contenido proteico en un 54% y modificó las características microestructurales de los geles formados. La eliminación parcial de la proteína no modificó ( $p > 0.05$ ) las características reológicas de los geles. En una segunda etapa, los DDGAX dializados (DDGAXD) fueron sometidos a un tratamiento con la enzima O-glicosidasa para eliminar la proteína e identificar el enlace carbohidrato-aminoácido en la asociación AX-proteína. La proteína asociada a DDGAX presentó un rango de peso molecular de 6 a 14 kDa. Se identificó la secuencia parcial ATWEGER (alanina, treonina, triptófano, ácido glutámico, glicina, ácido glutámico y arginina), correspondiente a un fragmento de la proteína de DDGAX.

La proteína se encuentra unida al carbohidrato mediante un enlace covalente. Los resultados indican que la eliminación parcial de la proteína no modifica las características viscoelásticas de los geles formados y que la proteína podría estar asociada covalentemente al AX mediante los aminoácidos serina y/o treonina.

**Palabras clave:** Arabinoxilanos, ácido ferúlico, gelificación, proteína, enlace covalente.

## ABSTRACT

Arabinoxylans (AX) are heterogeneous non-starch polysaccharides present in cereal grains. AX can form gels through covalent cross-linking of ferulic acid (FA) resulting in the formation of dimers (di-FA) and trimer (tri-FA) of FA. The properties of AX gels depend on the structural characteristics of the polysaccharide. Protein content of AX is one such structural characteristic, the impact of which on gelling and gel properties has not been reported so far. The objective of the present study was to remove the protein associated with AX, using enzymatical (protease, O-glycosidase) treatments in order to investigate the type of linkage between AX-protein, and evaluate the effect of the enzymatic modification on the viscoelastic and microstructural characteristics of the formed gels. On a first research stage, the AX extracted from distillers dried grains with solubles (DDGAX) were characterized. The AX presented a purity of 64% (w/w), a molecular weight of 209 kDa, a FA content of 6.05 µg/mg, an A/X ratio of 1.08, an intrinsic viscosity of 292 mL/g and 8.24% of protein content. A protease treatment reduced 54% of the protein content in DDGAX and modified the microstructural characteristics of the formed gels. The rheological characteristics of the gels were not affected ( $p > 0.05$ ) by the partial elimination of the protein. On a second stage, the dialyzed DDGAX (DDGAXD) were subjected to a treatment with O-glycosidase in order to eliminate the protein and help to identify the nature of the aminoacid-carbohydrate linkage in the arabinoxylan-protein association. The protein associated with AX showed a molecular weight range of 6-14 kDa. A partial sequence, ATWEGER (alanine, threonine, tryptophan, glutamic acid, glycine, glutamic acid and arginine) was identified, corresponding to a fragment of the DDGAX protein. The protein is covalently associated with the arabinoxylan. The results indicate that the partial elimination of the protein do not modify the viscoelastic characteristics of the gels

formed and that the protein could be covalently associated with arabinoxylan through serine and/or threonine.

**Keywords:** Arabinoxylan, ferulic acid, gelling, protein, covalent linkage.

## I. INTRODUCCIÓN

Los arabinosilanos (AX) son polisacáridos heterogéneos no amiláceos que se encuentran en varios tejidos de los granos de cereales (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). Entre sus propiedades funcionales resalta su capacidad para formar geles covalentes en presencia de agentes oxidantes. Estos geles poseen propiedades que les permiten ser utilizados como matrices de liberación controlada para la industria alimentaria y biomédica (Berlanga-Reyes et al., 2009a y b; Carvajal-Millan et al., 2007). Estas propiedades dependen de las características del polisacárido, por lo que el conocimiento de su estructura es muy importante al momento de buscar nuevas alternativas para su aplicación.

Existe controversia acerca de la asociación AX-proteína. Se ha demostrado la presencia de proteína residual asociada o fuertemente ligada al polisacárido que permanece remanente aún después de utilizar ciertos métodos de purificación (Ebringerova, 1994; Saulnier et al., 1995a; Yadav et al., 2007b). Sin embargo, no se ha determinado hasta qué punto es posible eliminar esta proteína mediante métodos enzimáticos y químicos específicos. Debido a que la capacidad gelificante de los AX depende de su composición y estructura, el conocimiento de sus características estructurales y su efecto en las propiedades del gel es esencial para la construcción de un conocimiento profundo acerca de la naturaleza de los geles y para el diseño de geles con diferentes características que pudieran tener nuevas aplicaciones.

En relación al tipo de enlace presente en la asociación AX-proteína, se han propuesto dos vías mediante las cuales podría estar unida la proteína al polisacárido. Una de éstas involucra la posible asociación entre ácido ferúlico (AF) y aminoácido, y la otra una unión entre carbohidrato y aminoácido. Sin embargo, no se ha logrado determinar con precisión el tipo de enlace entre la

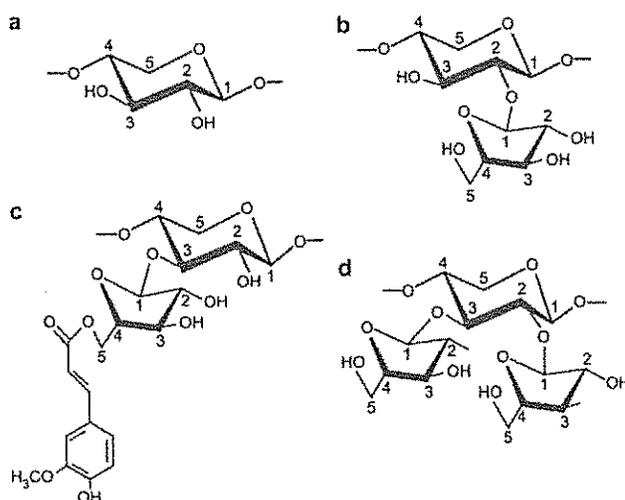
asociación AX-proteína (Saulnier et al., 1995a). Existen estudios relacionados con la asociación AX-proteína y su relación con la gelificación (Bettge y Morris, 2007; Girhammar y Nair, 1995; Morita et al., 1974). Sin embargo, el papel que desempeña la fracción proteica en la capacidad gelificante de los AX aún no está claro.

En este estudio se evaluó el efecto de la remoción de proteína asociada al arabinoxilano en su capacidad gelificante y en las características viscoelásticas y microestructurales de los geles formados y se investigó si esta proteína está unida al arabinoxilano de forma covalente mediante una unión O-glicosídica carbohidrato-proteína.

## II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### II.1. Estructura Química de los Arabinoxilanos

La estructura de los AX consiste en una cadena de xilosas unidas entre sí por enlaces  $\beta$ -(1-4) y residuos de arabinosa unidos a la cadena principal. Los residuos de arabinosa pueden estar unidos a la cadena de xilosas en posiciones O-3 y/o O-2, lo que resulta en cuatro estructuras diferentes: monosustituida, disustituida y no sustituida (Figura 1). Aunque en promedio, el 50-60% de los residuos de xilosa de la cadena se presentan en la forma no sustituida, la cantidad y distribución de estas estructuras varía dependiendo de la fuente del polisacárido (Izydorczyk y Dexter, 2008).



**Figura 1.** Posición de arabinosas en arabinoxilanos. a) No sustituida, b) monosustituida en O-2, c) monosustituida en O-3 con un residuo de ácido ferúlico esterificado en arabinosa y d) disustituida en O-2,3. Fuente: Izydorczyk y Dexter, 2008.

La estructura química de los AX puede variar en cuanto a su complejidad de una fuente a otra. Los AX de salvado de maíz, sorgo y arroz son más complejos en comparación a los de trigo, cebada y centeno, ya que además de arabinosa contienen residuos de xilosa, galactosa y ácido glucurónico. En AX de maíz, los residuos de ácido glucurónico se unen a la posición O-2 de la xilosa, y algunos residuos de galactosa y xilosa a la arabinosa ramificada (Saulnier et al., 1995a). Una característica única de estos polisacáridos, es la presencia de ácidos hidroxicinámicos como el ferúlico y cumárico, que se encuentran esterificados a la arabinosa en posición O-5 (Smith y Hartley, 1983). Además, presentan residuos de acético esterificados (3-5%) directamente a la cadena de xilosas en las posiciones O-2 ó O-3 (Agger et al., 2010).

Los AX poseen características estructurales que pueden variar y afectar así sus propiedades fisicoquímicas. Estas variaciones se ven reflejadas en el grado de polimerización (GP), proporción arabinosa/xilosa (A/X), proporción y secuencia de enlaces glicosídicos, patrón de sustitución de arabinosas en la cadena y en la presencia de otros sustituyentes (Izydorczyk y Biliaderis, 2007).

La relación A/X se refiere al grado de ramificación o sustitución de los AX e indica el número de unidades de arabinosa unidas a la cadena principal de xilosas. Esta proporción puede variar de 0.3 a 1.1 dependiendo del origen del polisacárido (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). En AX de pericarpio de maíz se han encontrado altos grados de sustitución que van desde 0.8 a 0.85 (Van Laar et al., 2002; Carvajal-Millan et al., 2007; Yadav et al., 2009; Yadav et al., 2007b). Esta relación no detalla las características estructurales de estos polímeros, pero está relacionada con la proporción de las cuatro estructuras moleculares, en las cadenas de los AX (Izydorczyk y Biliaderis, 2007).

Los AX se clasifican como extraíbles y no extraíbles en agua (WE-AX y WU-AX, respectivamente) en base a su solubilidad (Niño-Medina et al., 2010). Estas diferencias en la solubilidad pueden estar relacionadas con los patrones de sustitución y el grado de entrecruzamiento. También pueden deberse a enlaces covalentes entre los grupos carboxilo de ácidos urónicos y los grupos hidroxilo de los AX, así como a la formación de puentes diferúlicos entre las cadenas

adyacentes (Fincher y Stone, 1986; Gruppen et al., 1990). En los granos de cereales, los WE-AX se localizan principalmente en el endospermo y los WU-AX en la capa aleurona y cascarilla (Niño-Medina et al., 2010). A pesar de que las características estructurales de los WU-AX han sido menos estudiadas, se ha demostrado que su estructura es similar a la de los WE-AX, pero con valores más altos de peso molecular promedio y proporción A/X (Izydorczyk y Biliaderis, 1995).

## II.2. Asociación Arabinoxilano-Proteína

Los AX de maíz se obtienen mediante tratamientos que involucran una hidrólisis alcalina controlada. La composición de estos AX es: xilosa (50-60%), arabinosa (31-35%), galactosa (7-8%) y ácido glucurónico (4-5%). Además, se ha demostrado que presentan un porcentaje de proteína fuertemente asociada o ligada a su estructura que varía del 2-5% (p/p). Este porcentaje puede variar dependiendo del origen y el método utilizado para su obtención (Whistler y Bemiller, 1956; Yadav et al., 2007b).

La asociación AX-proteína y el papel que podría desempeñar esta fracción proteica en el polisacárido ha sido tema de polémica. En diversos estudios, se ha observado cierto contenido de proteína que permanece remanente después de los procesos de extracción y purificación de los AX. En maíz, las extracciones secuenciales con proteasas y álcali han permitido obtener AX con un contenido de proteína del 0.4 al 5% (Saulnier et al., 1995a). Resultados similares fueron encontrados en centeno, donde el extracto purificado con pronasas y álcali presentó un contenido de proteína del 1.1% (Ebringerova et al., 1994). Así mismo, en AX de trigo se ha obtenido un contenido del 4.2%, después de hacer una purificación con pronasas (Morales-Ortega et al., 2013). Los estudios anteriores indican que aún después de utilizar métodos para purificar al extracto, cierto contenido de proteína permanece remanente en el polisacárido.

Por otro lado, se han utilizado métodos que involucran extracciones acuosas para separar a los AX en base a su solubilidad en agua del resto de los componentes. En estos casos, el material proteico remanente puede extraerse con solventes no polares como el etanol acuoso. Esto permite reducir el contenido de proteína hasta 2-0.6%, pero sin lograr una eliminación completa (Fincher y Stone, 1974; Yadav et al., 2010). Cabe mencionar que en trigo, la presencia de la proteína asociada al AX fue confirmada mediante estudios de microscopía de fuerza atómica. Los autores sugieren que la proteína está fuertemente ligada y posiblemente asociada de manera covalente al polisacárido (Adams et al., 2003). Sin embargo, no se ha establecido cómo es que esta fracción proteica se encuentra unida al polisacárido.

Con base en los estudios anteriores, es claro que existe proteína que se encuentra asociada de alguna forma al polisacárido, la cual no es posible eliminar con los métodos de extracción y purificación utilizados comúnmente. No obstante, no se ha determinado hasta qué punto podría la aplicación de otros métodos más específicos ser capaces de lograr la eliminación de esta fracción proteica. Esto permitiría, además de identificar el tipo de enlace que existe entre el AX y la proteína, contribuir al conocimiento de su estructura para tomar ventaja del polisacárido en futuras aplicaciones.

Yadav et al. (2011), lograron aislar e identificar a la proteína asociada a los AX de maíz. Esta proteína presentó una secuencia de péptidos y peso molecular (22 kDa) similares a la proteína hidrofóbica alfa-zeína del maíz. Además, indicaron que dicha proteína puede estar unida de manera covalente o física a la estructura de los AX, lo que les permite actuar como emulsionante. En este estudio, los AX fueron obtenidos mediante una hidrólisis alcalina, seguida de una precipitación con etanol. Sin embargo, durante la extracción no se indicó el uso de enzimas proteolíticas para purificar el extracto, lo cual se vio reflejado en un alto contenido de proteína (8.5%). Debido a esto, es posible que la proteína aislada haya presentado residuos proteicos que no formaban parte integral del polisacárido y que tal vez no fueron eliminados durante el proceso de extracción.

En cuanto a información relacionada con el perfil de aminoácidos de las proteínas asociadas a los AX, se tienen pocos estudios. Los aminoácidos más abundantes detectados en estas proteínas se muestran en la Tabla 1. Por ejemplo, la proteína identificada en AX de pericarpio de maíz ha presentado cantidades importantes de alanina (Ala), valina (Val), prolina (Pro), glicina (Gly), glutamina (Gln), leucina (Leu), treonina (Thr), tirosina (Tyr) e hidroxiprolina (Hyp) (Cirre et al. 2014; Saulnier et al., 1995a; Yadav et al., 2011). Por su parte, en la proteína de AX de centeno, se ha observado un menor contenido de Pro, pero rico en Gly y Ser (Ebringerova et al., 1994). Aunque se conocen los aminoácidos presentes en las proteínas asociadas a los AX, aún no ha sido posible determinar qué aminoácidos podrían estar participando en dicha asociación.

**Cuadro 1. Aminoácidos más abundantes en las proteínas asociadas a AX.**

Fuente de AX	Contenido de proteína (%)	Aminoácidos
Pericarpio de maíz <sup>abc</sup>	5-8.5	Ala, Val, Pro, Gly, Gln, Leu, Thr, Tyr, Hyp
Centeno <sup>d</sup>	1.1	Gly, Ser, Ala, Arg

<sup>a</sup>(Saulnier et al., 1995a); <sup>b</sup>(Yadav et al. 2011); <sup>c</sup>(Cirre et al. 2014), <sup>d</sup>(Ebringerova, 1994); Ala: Alanina, Pro: Prolina, Gly: Glicina, Hyp: Hidroxiprolina, Thr: Treonina, Ser: Serina, Arg: Arginina, Val: Valina, Gln: Glutamina, Leu: Leucina; Tyr: tirosina.

Cirre et al. (2014) aplicaron un tratamiento con proteasas a fracciones de AX con la finalidad de investigar el tipo de enlace entre el AX y la proteína. Ellos encontraron que después de 24 y 48 h de tratamiento, el peso molecular del AX no se modificó. Lo anterior indicó que la proteína no fue digerida por la proteasa, resultado que usualmente se presenta en la goma arábica al observar una reducción considerable en su peso molecular. Esto sugiere que el enlace entre AX y proteína no parece ser similar al que se presenta en la goma arábica, el cual se considera que se da vía hidroxiprolina y posiblemente a través de serina.

Son escasos los estudios relacionados con la naturaleza del enlace en la asociación AX-proteína. Con base en éstos, se han propuesto dos vías mediante las cuales podría estarse dando la unión entre el AX y la proteína. Una de ellas involucra una posible interacción AF-aminoácido y la otra, una unión aminoácido-carbohidrato. En el primer caso, se sugiere la interacción entre el aminoácido Tyr de las proteínas y el residuo de AF de los AX, mediante la formación de un dímero (AF-Tyr) (Neukom y Markwalder, 1978) (Figura 2). Piber y Koehler (2005), detectaron este entrecruzamiento en harinas de trigo y centeno, pero no lograron identificar con precisión la estructura formada. Por ello, propusieron diferentes estructuras para el dímero formado, las cuales sugieren un enlace covalente entre el AF y la Tyr, predominando el de tipo éter.

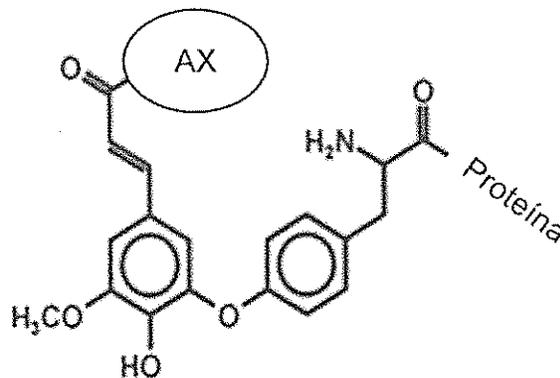


Figura 2. Estructura propuesta para el dímero AF-Tyr. (adaptada de Piber y Koehler, 2005).

La otra posible interacción es la unión entre carbohidrato y aminoácido. En uno de los primeros estudios, se observó que la proteína asociada a los AX de pericarpio de maíz presentó un elevado contenido de Hyp y Pro. Debido a que las proteínas de la pared celular del pericarpio de maíz son ricas en estos aminoácidos, se sugirió que la proteína podría relacionarse con alguna de las glicoproteínas del maíz. Aunque se conoce que los enlaces glicosídicos a través de Hyp son resistentes a tratamientos alcalinos, no se ha determinado la naturaleza del enlace entre la proteína y el AX (Saulnier et al., 1995a). Esto lleva a sugerir la posibilidad de que la interacción entre la proteína y el AX sea

mediante un enlace de tipo covalente que involucre la unión del polisacárido a la proteína a través de la Hyp. Además, si este enlace se presentara en la asociación AX-proteína, su resistencia al álcali se confirmaría al saber que la proteína permanece asociada al AX aún después de la extracción.

Por otro lado, en centeno fue aislado un complejo AX-proteína y se determinó que la proteína asociada al polisacárido era rica en los aminoácidos Ser y Gly (Ebringerova et al., 1994). Se propuso que las cadenas de xilosas se encuentran unidas covalentemente a un núcleo proteico, con una estructura similar a la de complejos de arabinogalactanas-proteicas (AGP's) aisladas en trigo. En dicha estructura, la unión del carbohidrato a la proteína se da mediante un enlace Hyp-galactosa (Strahm et al., 1981). En este contexto, se sabe que los AX de pericarpio de maíz pueden presentar residuos de galactosa y que la proteína asociada a éstos presenta contenidos elevados de Hyp. Por lo anterior, no se descarta la posibilidad de que pudiesen estar presentes enlaces de este tipo entre el AX y la proteína. Sin embargo, esta es solamente una propuesta de la estructura que podría formarse, la cual no ha sido comprobada. Para ello es necesario hacer estudios más profundos que permitan determinar el tipo de enlace que existe en esta asociación.

### II.3. Características Físicoquímicas de los Arabinoxilanos

Los AX presentan ciertas características físicoquímicas que les confieren distintas propiedades funcionales. Dichas propiedades dependen de la conformación, interacciones cadena-cadena, con otro polímero o el solvente (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Entre las características más importantes se encuentran su peso molecular, solubilidad y viscosidad, las cuales se describen a continuación.

### II.3.1. Peso Molecular

El peso molecular (PM) de los AX varía dependiendo del origen y el método que se utilice para su determinación. Este PM se encuentra en rangos de 10 hasta 10,000 kDa en WE-AX y excede los 10,000 kDa en los WU-AX (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). En los WU-AX, se requiere de una extracción que puede propiciar la degradación de las cadenas poliméricas y afectar el PM de las mismas. El PM de AX de pericarpio de maíz extraídos con tratamiento alcalino se encuentra entre 244 a 491 kDa con un índice de polidispersidad (IP) de 1.35 a 2.5. En este caso, el PM es afectado por las condiciones de extracción (tiempo, pH y T) (Chanliaud et al., 1995; Yadav et al, 2007a; Yadav et al., 2009).

### II.3.2. Solubilidad

La solubilidad en agua de los AX y de los polisacáridos en general depende de las interacciones entre cadena-cadena y cadena-solvente. Diversos factores como la longitud de la cadena, la presencia de grupos laterales, así como su distribución pueden modificar la solubilidad de los polímeros. En general, la presencia de ramificaciones impide la interacción entre cadenas favoreciendo la solubilidad de los polímeros (Saulnier et al., 2013).

Otro factor que influye en la solubilidad de los AX es la presencia de enlaces covalentes con otros polímeros de la pared celular. Tal es el caso de los WU-AX que tienen mayor proporción de A/X que los WE-AX, lo cual debería reflejarse en una alta solubilidad, pero la presencia de enlaces covalentes de puentes diferúlicos entre cadenas afecta disminuyendo su solubilidad (Saulnier et al., 2013). Andrewartha et al. (1979), encontraron que conforme la proporción de A/X disminuye, la solubilidad de los AX se reduce considerablemente. El valor crítico de A/X que identificaron fue  $\sim 0.43$ , en el cual se observó que la solubilidad de los AX disminuyó abruptamente. Con lo anterior, se puede asumir que la

presencia de segmentos de residuos de xilosa no sustituidos en la cadena polimérica favorece la formación de agregados intermoleculares.

### II.3.3. Viscosidad

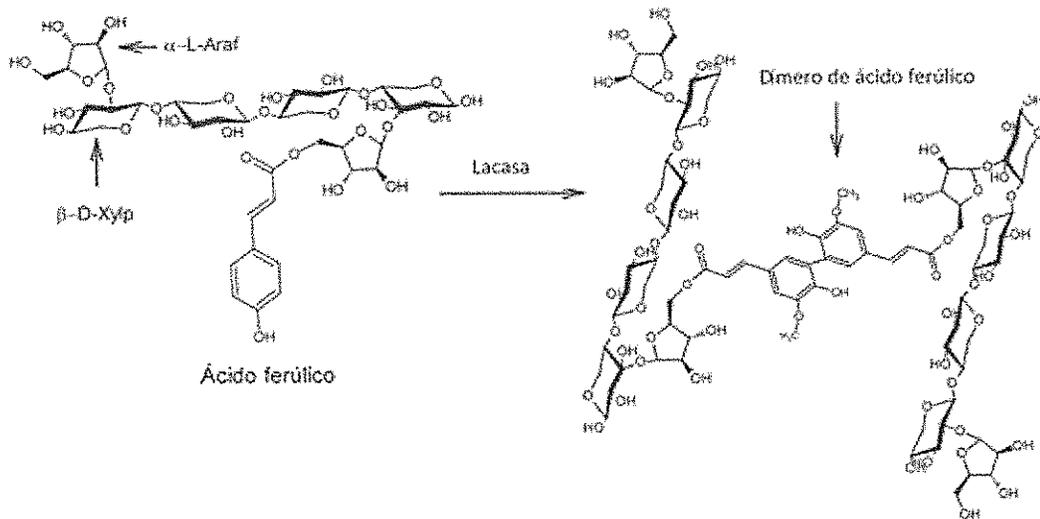
La viscosidad de una solución polimérica es un parámetro que se relaciona directamente con las propiedades de la molécula (conformación, PM, distribución de pesos moleculares) y la concentración del polímero (Lefebvre y Doublier, 2005). La viscosidad intrínseca ( $[\eta]$ ) es una medida del volumen hidrodinámico que ocupa el polímero aislado en la solución y no debe confundirse con la viscosidad de la solución (Saulnier et al., 2007). Como resultado de los altos PM y rigidez local de las cadenas, los AX se caracterizan por presentar alta viscosidad en soluciones acuosas (Izydorczyk y Biliaderis, 2007).

En WE-AX de trigo, la  $[\eta]$  se encuentra en el rango de 2 a 6 dL/g con un valor promedio de 4 dL/g (Rattan et al., 1994; Saulnier et al., 1995b). Estos valores varían dependiendo del método de extracción, la variedad del cereal, así como del PM y/o conformación del polímero (Saulnier et al., 2007). Niño-Medina et al. (2009), registraron una  $[\eta]$  de 1.83 dL/g en AX extraídos de nejayote. En AX extraídos de pericarpio de maíz se han encontrado valores de  $[\eta]$  entre 1.35 y 2.08 dL/g (Carvajal-Millan et al., 2007; Yadav et al., 2007a; Yadav et al., 2009).

## II.4. Capacidad Gelificante de los Arabinoxilanos

Los AX forman soluciones altamente viscosas e hidrogeles en presencia de agentes oxidantes, ya sea vía enzimática con peroxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lacasa/O<sub>2</sub> y ácido linoleico/lipoxigenasa, o química con el persulfato de amonio y el cloruro férrico. Esta característica se debe al entrecruzamiento covalente de las cadenas de AX mediante la dimerización de AF (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). El proceso de gelificación resulta de la formación de redes tridimensionales entre cadenas de

AX entrecruzadas por los dímeros y trímeros de AF en las que la fase acuosa es retenida (Figura 3).



**Figura 3.** Formación de la red tridimensional de AX por acción de la enzima lacasa (adaptado de Martínez-López et al., 2013).

La dimerización de AF se lleva a cabo en dos etapas: Primero, se genera un radical por el ataque de una molécula de H del grupo hidroxilo en la posición del anillo fenólico. Este radical es estabilizado por la resonancia dentro de la misma molécula y puede localizarse en posición 4-O, C-5 o C-8. En el siguiente paso, se da el acoplamiento de los radicales de dos monómeros diferentes y la formación de enlaces covalentes que conectan fuertemente a las dos cadenas de AX (Ralph et al., 1994). Así, la estructura de los dímeros formados depende de la distribución de los radicales libres (Saulnier et al., 2013).

La desaparición de AF, así como la formación de dímeros y trímeros derivados durante la primera etapa de la gelificación de los AX, demuestran la intervención de estos residuos durante el proceso (Carvajal-Millan et al., 2005a; Izydorczyk et al., 1991). En geles de AX se han identificado cinco dímeros de AF: 5-5', 8-5' benzo, 8-8', 8-O-4' y 8-5', siendo los dos últimos los más abundantes (Saulnier et al., 2013). Por otro lado, Carvajal-Millan et al. (2005a) reportaron la

presencia de un trímero de AF (4-O-8', 5-5') en geles de AX de trigo inducidos por lacasa, pero en concentraciones menores que las de los dímeros. Actualmente, los trímeros identificados y caracterizados estructuralmente en los AX son el 5-5'/8-O-4', 8-O-4'/8-O-4', 8-8'(cíclico)/8-O-4', 8-O-4'/8-5'(no cíclico), y 5-5'/8-O-4'(H<sub>2</sub>O). También se han identificado dos tetrámeros de AF en AX de pericarpio de maíz, el 4-O- 8'/5-5'/8-O-4' y el 4-O- 8'/5-5'/8-5'(no cíclico) (Bunzel, 2010).

Los AX de pericarpio de maíz presentan un alto contenido de ácidos fenólicos (4%), siendo los principales el AF y sus dímeros. El AF se ha encontrado en concentraciones de 0.32-0.34 µg/mg de AX de pericarpio (Carvajal-Millan et al., 2007; Lapierre et al., 2001). En el estudio de Carvajal-Millan et al. (2007), se detectaron contenidos de 0.77 y 0.39 µg/mg de dímeros y trímeros de AF, respectivamente, siendo el dímero 5-5' la estructura más abundante. Por su parte, Lapierre et al. (2001), encontraron un contenido total de 0.60 µg/mg de dímeros en su muestra, predominando las estructuras 8-5' y 5-5'.

Como se ha mencionado, la capacidad gelificante de los AX está determinada en gran parte por sus características estructurales. Los entrecruzamientos entre las cadenas de AX dependen de la presencia de AF, por lo que su concentración y distribución puede influir en la gelificación. Aunque el rol del AF es muy importante durante la formación del gel, existen otros aspectos que podrían influir de alguna manera durante el proceso de gelificación y por lo mismo ser considerados. Por ejemplo, el PM y la proporción A/X de los AX, así como también podría ser la asociación entre el AX y la proteína. Estos aspectos del polisacárido son los que le propician las características viscoelásticas y estructurales al gel formado, las cuales a su vez le confieren distintas propiedades funcionales. Así, los geles pueden tener diferentes aplicaciones dependiendo de las propiedades funcionales que presentan.

Los geles de AX poseen sabor y olor neutro, una alta capacidad de absorción de agua y son resistentes a cambios en el pH o fuerza iónica debido a la naturaleza de sus enlaces covalentes (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Estos geles generalmente son fuertes, se forman rápidamente, son estables al calor y

no presentan sinéresis después de periodos prolongados (Carvajal-Millan et al., 2005a). Además, presentan una estructura meso y macroporosa y naturaleza de fibra dietaria, lo que les permite su aplicación potencial como matrices de liberación controlada de agentes activos en distintos campos (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Estas propiedades dependerán de la capacidad gelificante y de las características estructurales del gel. Sin embargo, hace falta más conocimiento sobre la relación entre las características del AX y la funcionalidad de los geles formados. Una de estas características que podría ser importante es su asociación con la proteína y el efecto que podría tener en el proceso de gelificación.

## II.5. Asociación AX-Proteína y Gelificación

La asociación AX-proteína y el papel que podría desempeñar la fracción proteica en el proceso de gelificación de los AX son temas de polémica. Uno de los primeros estudios, sugiere que la proteína participa en la gelificación, por lo que es necesaria para que se lleve a cabo dicho proceso (Neukom et al., 1962). Contrario a esto, Morita et al. (1974), mostraron evidencia de geles formados con fracciones de AX libres de proteína. Otros estudios indicaron que el uso de enzimas proteolíticas en soluciones de AX previenen la gelificación, y si son aplicadas en un gel provocan su degradación (Girhammar y Nair, 1995; Neukom y Markwalder, 1978). A pesar de que hay varios trabajos en los que se ha estudiado la asociación AX-proteína en el proceso de gelificación, los resultados obtenidos no son consistentes. Debido a esto, no ha sido posible determinar el papel que desempeña la proteína y cómo podría influir en la capacidad gelificante de los AX.

Por otro lado, se han realizado diversos estudios con la finalidad de identificar las posibles interacciones entre el AX y la proteína durante la gelificación. La mayoría de estos experimentos han sido en preparados de harinas de cereales, en donde se adicionan aminoácidos modelo para observar

las interacciones que podrían darse entre éstos y el AF, y su efecto en la gelificación. Algunos autores mencionan que en presencia de proteínas, el AF podría enlazarse a residuos de tirosina (Tyr) o cisteína (Cys), y que este último aminoácido inhibe la gelificación (Moore et al., 1990). Girhammar y Nair (1995) explican esta inhibición en la gelificación como un efecto de competencia por el agente oxidante durante la reacción. Por su parte, Neukom y Markwalder (1978) sugieren dos vías en las cuales la proteína podría estar involucrada en la gelificación. En la primera, el AF podría enlazarse a un grupo amino terminal, formando un enlace pseudopeptídico. En la segunda, el AF asociado al AX podría entrecruzarse con el residuo de Tyr. Esta última vía es la que coincide con los resultados de la mayoría de los estudios realizados.

En harinas de trigo y centeno, se ha encontrado el entrecruzamiento covalente de un dímero de AF-Tyr. Esto puede deberse a la presencia de Tyr libre en la harina y AF en los AX del endospermo, así como a la lignina de las capas externas del grano. Sin embargo, no se descarta la idea de que sea un nuevo entrecruzamiento covalente generado entre el AF de los AX y la Tyr de las proteínas del gluten presente en la harina de cereales (Piber y Koehler, 2005). De igual manera, en harinas de trigo sometidas a gelificación oxidativa fue posible observar la interacción entre AX-proteína mediante puentes de AF-Tyr (Bettge & Morris, 2007). Por su parte, Figueroa-Espinoza et al. (1999b) estudiaron la adición de Tyr en la gelificación oxidativa en presencia de la enzima manganeso peroxidasa. Aunque la Tyr no afectó el proceso de gelificación, se observó una oxidación acelerada del AF, pero con una escasa formación de dímeros de AF. Ellos indicaron que pudo haberse dado una interacción entre AF y Tyr, lo cual sugiere la posibilidad de la existencia de un enlace covalente entre las proteínas y el AX.

Oudgenoeg et al. (2001) demostraron que la Tyr puede acoplarse mediante un enlace covalente a dos moléculas de AF en presencia de la enzima peroxidasa, por lo que se sugiere la posibilidad de un enlace similar entre las proteínas y los AX. En un estudio similar se utilizaron péptidos modelo que contenían Tyr, los cuales fueron sometidos a reaccionar con AF en presencia de

la enzima lacasa. Los investigadores encontraron que la Tyr formaba un enlace covalente con el AF y fue identificado como uno de tipo éter (enlace isoditirosina) (Mattinen et al., 2005).

Los estudios expuestos coinciden en que la interacción que se da entre el AX y las proteínas durante la gelificación, involucra el entrecruzamiento covalente AF-Tyr y que este podría ser de tipo éter. Aunque dicho entrecruzamiento ha sido identificado en condiciones simuladas adicionando al aminoácido Tyr, se puede plantear como una posibilidad que ciertas interacciones en la asociación AX-proteína sean de esta naturaleza. El conocer el tipo de enlace en la asociación AX-proteína permite proponer la elaboración de estudios más profundos en los que sea posible eliminar la fracción proteica. Esto con la finalidad de evaluar el efecto de dicha fracción en la capacidad gelificante del polisacárido. Esta información, además de ampliar el conocimiento sobre la estructura de los AX permitiría un mejor entendimiento de la relación estructura-función en este polisacárido. Este conocimiento podría contribuir al diseño de geles de AX con funcionalidades específicas.

Por último, cabe mencionar que no existen estudios relacionados con la asociación AX-proteína y el efecto que podría tener la fracción proteica en la propiedad gelificante del polisacárido. La mayoría de los estudios que se han hecho están dirigidos a evaluar el papel de esta proteína sólo en la capacidad emulsionante del polisacárido.

### III. HIPÓTESIS

La remoción de proteína asociada al arabinoxilano modifica la capacidad gelificante del polisacárido y las características viscoelásticas y microestructurales de los geles formados.

La proteína está unida al arabinoxilano de forma covalente mediante la unión O-glicosídica carbohidrato-proteína.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1. General

Evaluar el efecto de la remoción de proteína asociada al arabinoxilano en su capacidad gelificante y en las características viscoelásticas y microestructurales de los geles formados e investigar si esta proteína está unida al arabinoxilano de forma covalente mediante la unión O-glicosídica carbohidrato-proteína.

### IV.2. Particulares

Extraer los arabinoxilanos de maíz y determinar sus características composicionales y fisicoquímicas.

Reducir el contenido de proteína en los AX mediante una proteasa y determinar su efecto en la capacidad gelificante del polisacárido y en las características viscoelásticas y microestructurales de los geles formados.

Investigar si la proteína está unida de forma covalente al arabinoxilano (unión carbohidrato-aminoácido).

## V. CARACTERÍSTICAS VISCOELÁSTICAS Y MICROESTRUCTURALES DE GELES DE ARABINOXILANOS FERULADOS: EFECTO DE LA REMOCIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA ASOCIADA AL POLISACÁRIDO

### V.1. Resumen

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de la eliminación parcial de proteína en la capacidad gelificante de los arabinosilanos (AX). Los AX (abreviados DDGAX) fueron extraídos a partir de los granos secos de la destilería con solubles (DDGS), el cual es un subproducto de la molienda seca para la producción de bioetanol. DDGAX mostró un espectro FT-IR típico al reportado para AX de otras fuentes. La distribución de peso molecular de DDGAX registró un banda ancha con un pico mayoritario a ~209 kDa. Su contenido de ácido ferúlico (FA) fue 6.05 µg/mg de AX. El tratamiento con proteasas disminuyó el contenido de proteína de DDGAX en un 54%. Las soluciones de DDGAX y DDGAX tratadas con proteasa (DDGAXP) al 2% (p/v) formaron geles inducidos por lacasa. La distribución de proteína en la red de AX fue estudiada mediante microscopía confocal de barrido láser. En los geles de DDGAXP, el tamaño de las zonas brillantes correspondientes a proteína disminuyó, resultando en una fase continua de la red del polisacárido. La microestructura de los geles de DDGAX y DDGAXP fue analizada por microscopía electrónica de barrido (SEM), observando una estructura más homogénea y compacta en DDGAXP. Los DDGAX fueron dializados para compararlos con los DDGAXP y evaluar el efecto de la disminución de proteína en la capacidad gelificante del polisacárido. Los resultados indican que la eliminación parcial de proteína no modifica las características viscoelásticas de los geles.

## V.2. Introducción

La producción de bioetanol ha ido en aumento de forma acelerada alrededor del mundo, especialmente en Estados Unidos. Actualmente, el maíz es la principal fuente para la producción de bioetanol en dicho país. Uno de los principales subproductos de la industria del bioetanol a partir de maíz son los granos secos de la destilería con solubles (DDGS), que consisten de todas las porciones no fermentables del grano de maíz como la fibra, las proteínas del germen y la proteína del endospermo (Du et al., 2009). Por lo general, los DDGS son utilizados como ingredientes en la producción de alimento para animales y vendidos a muy bajo costo. Con la finalidad de reducir el costo de la producción del bioetanol, el desarrollo de productos de alto valor agregado a partir de los DDGS ha sido foco de interés en los últimos años. Uno de los principales componentes de los DDGS es la fibra dietaria en forma de arabinoxilanos (AX).

Los AX son polisacáridos no amiláceos de los granos de cereales. La estructura de los AX consiste en una cadena lineal de residuos de xilosas unidos por enlaces  $\beta(1-4)$  y residuos de arabinosa unidos a la cadena principal en las posiciones O-3 y/o O-4. A su vez, algunos residuos de arabinosa se encuentran esterificados al FA en la posición O-5 (Izydorczyk & Dexter, 2008). Los AX pueden formar geles mediante el entrecruzamiento covalente del FA, que resulta en la formación de dímeros (di-FA) y un trímero (tri-FA) de FA (Carvajal-Millan et al., 2005a). Estos geles presentan alto potencial para la aplicación como matrices para la liberación controlada de biomoléculas, células para alimentos o industrias biomédicas, entre otros (Berlanga-Reyes et al., 2009b; Carvajal-Millan et al., 2006; Hernández-Espinoza et al., 2012; Morales-Ortega et al., 2014). Debido a que la capacidad gelificante de los AX depende de su composición y estructura (contenido de FA, relación arabinosa/xilosa, peso molecular), el conocimiento de las características estructurales y su efecto en las propiedades del gel es esencial para crear una comprensión profunda sobre la naturaleza de los geles. El contenido de proteína de los AX es tan solo una de las características estructurales, de la cual su impacto en la capacidad gelificante y las propiedades

del gel no ha sido estudiado. AX de diversas fuentes, especialmente los de maíz, se encuentran asociados a una pequeña pero significativa cantidad de proteína, la cual se conoce que imparte ciertas propiedades funcionales de interés al material, tales como la capacidad emulsionante (Yadav et al., 2008). Esta fracción proteica se encuentra fuertemente asociada con el AX, y la presencia de proteína residual asociada con el AX, aun después de tratamientos con proteasas, ha sido estudiada previamente (Ebringerova et al., 1994; Saulnier et al., 1995a; Yadav et al., 2011). Es incierto el papel que desempeña la fracción proteica en la capacidad gelificante y en las propiedades del gel de AX. En el presente estudio, nosotros nos enfocamos a comprender el papel de la proteína en los geles de AX. Los AX extraídos de DDGS (DDGAX) fueron tratados con proteasa (DDGAXP) para reducir su contenido de proteína. Enseguida, las características reológicas y microestructurales de los geles de DDGAX y DDGAXP obtenidos mediante un entrecruzamiento enzimático fueron estudiadas y comparadas.

## V.3. Materiales y Métodos

### V.3.1. Materiales

Como fuente de AX fue utilizado un residuo de la producción de bioetanol de maíz. La enzima lacasa (benzenediol: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) de *Trametes versicolor*, la proteasa tipo XIV (EC 232-909-5) de *Streptomyces griseus* y el resto de los productos químicos utilizados fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

### V.3.2. Métodos

V.3.2.1. Extracción de DDGAX de pericarpio de maíz. Los DDGAX fueron extraídos de acuerdo a la metodología establecida por Fierro-Islas (2014), con ciertas modificaciones. Ésta se basa en una hidrólisis alcalina controlada, con NaOH a 25 °C en oscuridad por un periodo de 30 min en agitación constante. La recuperación de los DDGAX fue mediante precipitación con etanol, seguido de un secado por intercambio de solventes.

V.3.2.2. Tratamiento con enzimas proteasas de DDGAX. Se preparó una solución de DDGAX (2% p/v) en agua y se ajustó el pH a 7.5 con NaOH 2 M. Las proteasas disueltas en agua (0.4 U/mg de AX) fueron adicionadas a la solución de DDGAX y se agitaron durante 2 min. Se dejó en incubación durante 4 h a 20 °C. La solución fue llevada a ebullición durante 10 min para terminar la reacción. Enseguida fue sumergida en agua fría. El extracto fue centrifugado a 6000 rpm a 20 °C durante 15 min (Hermle Z300, 220.97 V02 Rotor) y el sobrenadante fue recuperado y dializado durante 48 h a 4°C (membrana de éster celulosa Spectra/Por Biotech, 50 kDa). La solución dializada fue congelada y liofilizada para obtener DDGAX tratados con proteasa (DDGAXP).

V.3.2.3. Proteína. El contenido de proteína en DDGAX y DDGAXP fue determinado de acuerdo al método de Dumas, usando un analizador de nitrógeno Leco-FP 528 (AOAC, 1995).

V.3.2.4. Azúcares neutros. El contenido de azúcares neutros fue determinado después de una hidrólisis de los DDGAX con ácido trifluoroacético 4 N a 120 °C durante 2 h. La reacción fue detenida con agua fría y los extractos fueron evaporados bajo aire a 40 °C, se realizaron dos lavados con 200 µL de agua. Enseguida, los extractos fueron solubilizados en 1 mL de agua. El manitol fue utilizado como estándar interno. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro de 0.45 µm (Whatman) y analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna Supelcogel Pb (300 x 7.8 mm, Supelco, Inc., Bellefont, PA, USA) y un detector de índice de refracción Varian 2414 (Varian, St. Helens, Australia). Se utilizó agua filtrada (0.45 µm, Whatman) como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min a 80 °C (Carvajal-Millan et al., 2007).

V.3.2.5. Cuantificación de AF en DDGAX y DDGAXP. El contenido de compuestos fenólicos fue cuantificado mediante HPLC. Los compuestos fenólicos fueron extraídos mediante una saponificación controlada, seguido de una recuperación en éter de acuerdo a la metodología por Vansteenkiste et al., (2004). A 100 mg de DDGAX y DDGAXP se adicionaron 10 mL de NaOH 2 M y se pasó un flujo de nitrógeno de alta pureza a la superficie. Se incubaron por 2 h en la oscuridad a 35 °C, bajo agitación suave y se ajustó el pH a  $2.0 \pm 0.2$  con HCl 4 M o NaOH. Los fenoles fueron extraídos dos veces con éter dietílico y evaporando a 30 °C en presencia de nitrógeno de alta pureza. El extracto fue recuperado en 1 mL de una mezcla de metanol/agua/ácido acético (40/59/01) y se inyectó (20µL) en una columna Supelcosil LC-18-DB (250 x 4.6 mm, Supelco, Inc., Bellefont, PA). La temperatura de la columna fue de 35°C, utilizando una elución isocrática con un detector de arreglo de diodos. La detección se efectuó

a 320 nm, utilizando los factores de respuesta determinados por Rouau et al. (2003).

V.3.2.6. Determinación de viscosidad intrínseca. La viscosidad específica ( $\eta_{sp}$ ) de las soluciones de DDGAX fue determinada por viscosimetría capilar utilizando un tubo capilar de Oswald (tiempo de caída del agua 9.42 s). La  $\eta_{sp}$  se relacionó con la concentración DDGAX ( $\eta_{sp}/C$ ) para obtener la viscosidad reducida,  $\eta_{red}$  (ml/g), de acuerdo a Rao, 1993. La viscosidad intrínseca  $[\eta]$  fue determinada mediante la ecuación de Mead, Kraemer y Fouss (Kraemer, 1938; Mead y Fouss, 1942).

V.3.2.7. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR). El espectro FT-IR del polvo seco de DDGAX y DDGAXP fue analizado en un espectrofotómetro Nicolet FT-IR (Nicolet Instrument Corp. Madison, WI, US). Las muestras fueron compactadas en una pastilla con KBr (2 mg/200 mg KBr). Se utilizó una pastilla de KBr como blanco. Los espectros fueron medidos en modo de transmisión con una resolución de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

V.3.2.8. Distribución de peso molecular. La distribución del peso molecular de los AX fue determinada mediante HPLC a 38 °C, usando una columna TSKgel (Polymer Laboratories, Shropshire, U.K.) G5000 PWXL (7.8 x 300 mm). Se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de una solución de AX (0.5% p/v en  $\text{LiNO}_3$  0.1 M) filtrada a través de una membrana 0.2  $\mu\text{m}$  (Whatman) y fueron inyectados para su análisis. Se realizó una elución isocrática a 0.6 mL/min con  $\text{LiNO}_3$  0.1 M, el cual fue filtrado a través de una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  (Whatman). Para la detección fue utilizado un detector de índice de refracción Waters 2414. Los pesos moleculares fueron estimados después de una calibración universal utilizando pululanos como estándares (P50 a P800) (Carvajal-Millan et al., 2005b).

V.3.2.9. Diálisis de DDGAX. Los DDGAX disueltos en agua (2% p/v) fueron dializados durante 48 h a 4 °C (membrana de éster celulosa Spectra/Por Biotech, 50 kDa). La solución dializada fue congelada y liofilizada para obtener a los DDGAXD.

V.3.2.10. Gelificación de AX. Se prepararon soluciones de AX al 2% (p/v) utilizando un búfer de citrato fosfato 0.5 M a pH 5.5. La enzima lacasa fue adicionada a las soluciones de AX (0.2 U/mg de AX) como agente entrecruzante. Los geles se formaron durante 1 h a 25 °C.

V.3.2.11. Reología de baja deformación. Las mediciones reológicas se llevaron a cabo utilizando un reómetro dinámico de baja deformación (Discovery HR-3 rheometer; TA Instruments, New Castle, DE, US), de acuerdo a Vansteenkiste et al. (2004). La cinética de gelificación de los AX se realizó durante 1 h a 25 °C, a 0.25 Hz y 5 % de deformación. El espectro de frecuencia de los geles se obtuvo entre 0.1 y 10 Hz a 5 % de deformación y 25 °C. Las mediciones reológicas fueron realizadas por duplicado.

V.3.2.12. Microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de geles y soluciones de DDGAX y DDGAXP. La CLSM fue realizada con un microscopio confocal Leica TCS SPE (Leica Microsystems, Mannheim, Germany) en el modo de fluorescencia. La rodamina B isotiacionato (RITC) al 0.02% (p/v) fue utilizada como sonda fluorescente. La excitación de la RITC, usando un láser de He/Ne, fue a 532 nm y la emisión de la fluorescencia fue medida debajo de 570 nm. Las soluciones de AX (2% p/v) teñidas fueron colocadas en una placa antes y después de la adición de la enzima lacasa (Berlanga-Reyes et al., 2014).

V.3.2.13. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de los geles de DDGAX y DDGAXP liofilizados. Los geles de DDGAX y DDGAXP fueron congelados en inmersión con CO<sub>2</sub> y liofilizados a -40 °C/5 atm en un liofilizador Temp Lyph-Lock 6 (Labconco, Kansas, MO, EUA). La microestructura de los geles liofilizados fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido con un microscopio FEI Quata 200F (FEI Corporation, Hillsboro, OR) a un voltaje de 10 kV. Las imágenes fueron obtenidas en el modo imagen de electrones secundario (aka Everhart-Thornley Detector).

V.3.2.14. Análisis Estadístico. Las determinaciones químicas y reológicas se realizaron por duplicado con un índice de confiabilidad del 95 %. Los valores son expresados en valores de medias. Se utilizó el programa estadístico NCSS.

## V.4. Resultados y Discusión

### V.4.1. Extracción y Caracterización de DDGAX

Los DDGAX fueron extraídos mediante una hidrólisis alcalina de 30 min. El rendimiento de DDGAX fue de 2.5% (p/p) en base a materia seca (ms, p DDGAX/p DDGS), resultado similar al reportado por Carvajal-Millan et al. (2007) para AX de pericarpio de maíz. La composición de DDGAX se presenta en el Cuadro 2. El contenido de DDGAX fue estimado a partir de la suma de la proporción xilosa + arabinosa y corresponde al 64.01% de la materia seca (ms) de los DDGAX recuperados. Así mismo, se detectaron residuos de glucosa, los cuales fueron similares a los encontrados en AX de pericarpio de maíz (Carvajal-Millan et al., 2007; Martínez-López et al., 2013; Fierro-Islas, 2014). También fueron cuantificados residuos de proteína. Se ha reportado que los AX de maíz presentan una estructura compleja y puede contener pequeñas cantidades de galactosa, ácido glucurónico, ácido acético y otros ácidos hidroxicinámicos como el cumárico (Fincher & Stone, 1986; Smith & Hartley, 1983). El contenido de proteína de los DDGAX fue del 8.24% (Cuadro 2), resultado similar al reportado por Yadav et al. (2011) para AX de maíz.

Los DDGAX presentaron un contenido de AF de 6.05  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de DDGAX (Cuadro 2). Este valor es mayor al que se ha encontrado para AX de pericarpio de maíz (Carvajal-Millan et al., 2007; Martínez-López et al., 2013), pero similar al obtenido por Fierro-Islas (2014) para AX obtenidos de DDGS. El tiempo de extracción de los AX en medio alcalino puede incrementar el rendimiento, pero a su vez puede llevar a una disminución en el contenido de AF, afectando así su capacidad de gelificación (Carvajal-Millan et al., 2007; Kale et al., 2013). Por ello, en este experimento se utilizó una hidrólisis de corto tiempo, ya que esta condición provee de un alto contenido de AF. La proporción arabinosa-xilosa (A/X) en DDGAX fue de 1.08 (Cuadro 2), indicando una estructura altamente ramificada. Debido a que el AF se encuentra esterificado a los residuos de arabinosa de la cadena del AX, un alto valor de A/X coincide con el elevado

contenido de AF en la muestra. Los DDGAX presentaron una viscosidad intrínseca ( $[\eta]$ ) de 292 mL/g, resultado similar al reportado para AX de pericarpio de maíz (Carvajal-Millan et al., 2007).

**Cuadro 2.** Composición de los DDGAX, DDGAXD y DDGAXP.

	DDGAX	DDGAXD	DDGAXP
Arabinosa <sup>a</sup>	33.36 ± 0.85	37.08 ± 1.58	38.60 ± 0.02
Xilosa <sup>a</sup>	30.65 ± 1.47	34.19 ± 1.17	35.72 ± 0.15
Glucosa <sup>a</sup>	5.11 ± 0.24	4.87 ± 0.13	4.55 ± 0.01
Proteína <sup>a</sup>	8.24 ± 0.10	8.24 ± 0.10	3.81 ± 0.91
Ácido ferúlico <sup>b</sup>	6.05 ± 0.40	6.39 ± 0.51	6.03 ± 0.36
A/X	1.08	1.08	1.08

Resultados obtenidos de dos repeticiones.

<sup>a</sup>Resultados expresados en g/100 g DDGAX.

<sup>b</sup>Ácidos fenólicos expresados en µg/mg DDGAX.

#### V.4.2. Tratamiento con Proteasas de DDGAX

Los DDGAX fueron sometidos a un tratamiento con proteasa para reducir su contenido de proteína. El rendimiento obtenido para los AX tratados con proteasa (DDGAXP) fue de 58% p/p. Los contenidos de proteína de DDGAX y DDGAXP fueron 8.24 y 3.81% (p/p), respectivamente (Cuadro 2), resultando en una reducción en el contenido proteico del 54% (p/p). Resultados similares han sido obtenidos en AX de maíz y trigo, utilizando pronasas (Morales-Ortega et al., 2013; Saulnier et al., 1995a). El contenido de AF en DDGAXP fue de 6.03 µg/mg de AX (Cuadro 2), lo cual indica que el tratamiento con proteasa no afectó la composición de ácidos fenólicos.

### V.4.3. Espectroscopía FT-IR

Las identidades moleculares de DDGAX y DDGAXP fueron analizadas mediante espectroscopía FT-IR (Figura 4). El espectro FT-IR mostró una amplia región de absorción entre 1200-800  $\text{cm}^{-1}$ , característico para polisacáridos (Iravani et al., 2011; Sárossy et al., 2013). DDGAX y DDGAXP presentaron un espectro típico para AX con una máxima absorción de la banda a 1035  $\text{cm}^{-1}$ , la cual puede asociarse al estiramiento C-OH, y las señales a 1070 y 898  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas con el estiramiento antisimétrico de los enlaces  $\beta$ -glicosídicos entre las unidades de los azúcares (Morales-Ortega et al., 2013).

La región comprendida de 3500 a 1800  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a la huella dactilar de polisacáridos relacionados a los AX, con la presencia de dos bandas (3400  $\text{cm}^{-1}$  asociada al estiramiento OH y 2900  $\text{cm}^{-1}$  relacionada con los grupos  $\text{CH}_2$ ) (Urias-Orona et al., 2010). La banda a 1640  $\text{cm}^{-1}$  se encuentra relacionada a los enlaces éster, la cual puede asociarse con la presencia de ácidos fenólicos como el ácido ferúlico (Séné et al., 1994). En ambos espectros se observó una modificación en las bandas de los grupos amida I y II (1656 y 1538  $\text{cm}^{-1}$ ), las cuales se asocian con la presencia de proteína (Hromádková et al., 2012). Debido a que la banda correspondiente al grupo amida I (1656  $\text{cm}^{-1}$ ) se traslapa con la banda de los enlaces éster, solamente la banda amida II podría relacionarse con la presencia de proteína. Sin embargo, el contenido de AF en DDGAX (6.03  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) no se afectó por el tratamiento con proteasa, lo cual sugiere que la modificación observada en las bandas de proteína se asocia con la disminución en el contenido proteico de la muestra.

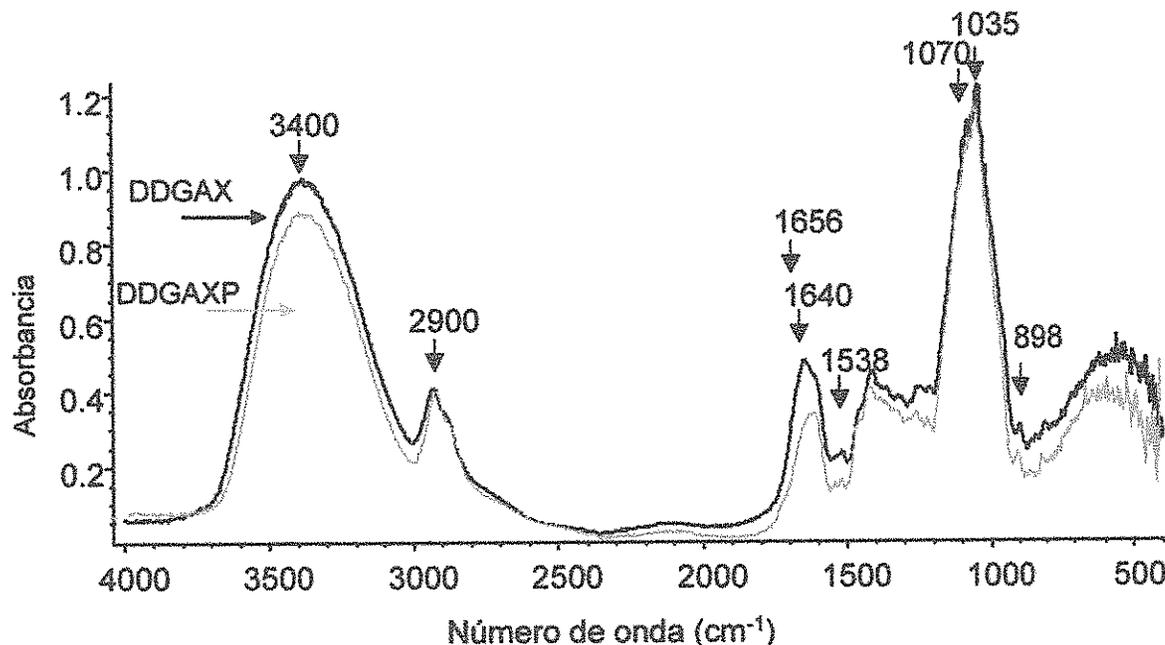
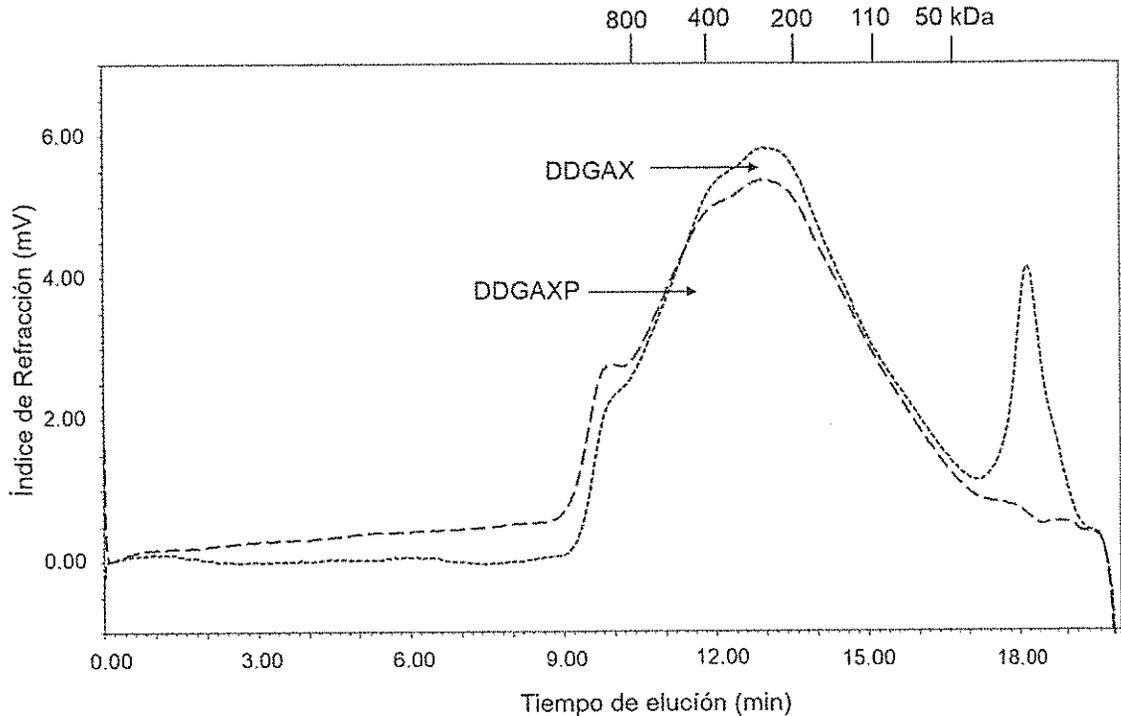


Figura 4. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) de DDGAX y DDGAXP.

#### V.4.4. Distribución de Peso Molecular de DDGAX y DDGAXP

La Figura 5 muestra el perfil de cromatografía de permeación en gel de DDGAX y DDGAXP. La distribución de peso molecular de DDGAX y DDGAXP registró una banda amplia con un pico mayoritario a ~209 y ~204 kDa, respectivamente. Estos resultados son similares a los obtenidos para AX de DDGS y pericarpio de maíz (Fierro-Islas, 2014; Martínez-López et al., 2013). El perfil de elución de DDGAX presentó un pequeño pico a la derecha del pico mayoritario, indicando una aparente segunda población de bajo peso molecular (tiempo de retención entre 17 y 19 min).

En DDGAXP, el tratamiento de diálisis purificó la muestra, observando una distribución de peso molecular más homogénea. Así mismo, el perfil de elución mostró que el tratamiento con proteasas no afectó el pico mayoritario de la distribución de pesos moleculares.



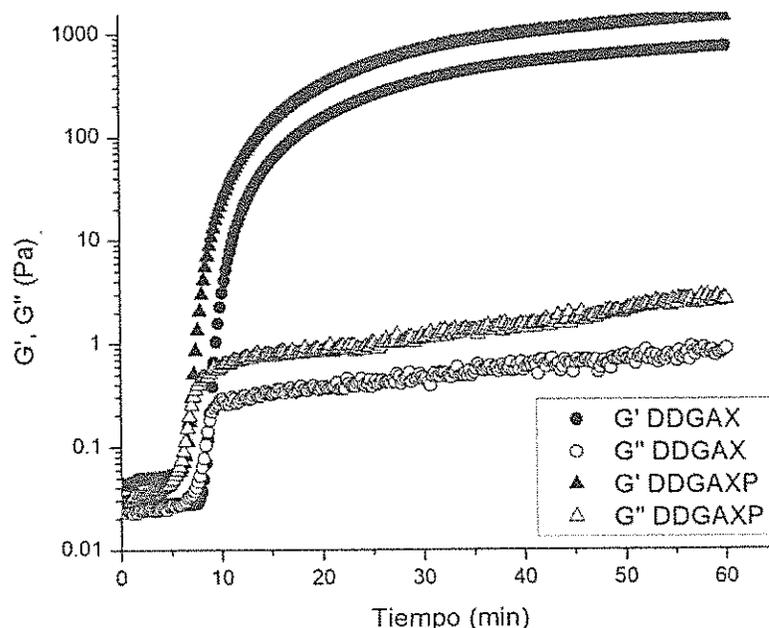
**Figura 5.** Perfil de elución de exclusión molecular por HPLC de DDGAX y DDGAXP. Los pesos moleculares de los pululanos utilizados como marcadores (kDa) para la calibración se muestran en la parte superior de la figura.

#### V.4.5. Gelificación de DDGAX y DDGAXP

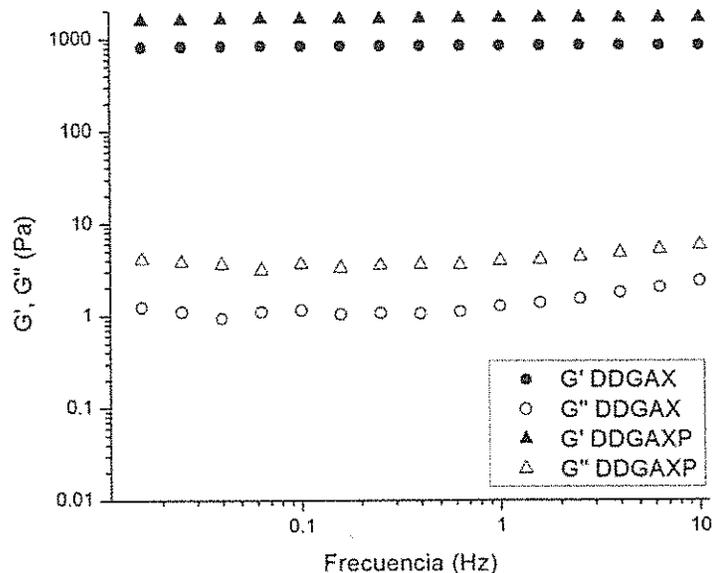
El proceso de entrecruzamiento de DDGAX y DDGAXP fue investigado mediante reología de baja deformación. La Figura 6 muestra el desarrollo del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) contra el tiempo de las soluciones de DDGAX y DDGAXP al 2% (p/v) durante una gelificación oxidativa inducida por lacasa. Los perfiles de gelificación de ambos geles exhibieron una cinética característica con un incremento en el módulo  $G'$  al inicio, seguido por una región de estabilidad (plateau). El tratamiento con proteasa afectó ( $p < 0.05$ ) los valores finales de  $G'$  y  $G''$  en los geles de DDGAX y DDGAXP, observando un aumento de  $767 \pm 39.30$  a  $1333 \pm 139.39$  Pa y de  $0.88 \pm 0.01$  a  $1.73 \pm 1.22$  Pa, respectivamente. Este aumento en el valor de  $G'$  para el gel de DDGAXP comparado con el gel de DDGAX puede atribuirse a la purificación del polisacárido por efecto de la diálisis

y a una disminución del impedimento estérico debido a la eliminación de proteína, promoviendo el entrecruzamiento entre las cadenas del polisacárido y resultando en la formación de un gel más fuerte.

Los tiempos de gelificación ( $t_g$ ), calculados a partir del punto de cruce de las curvas de  $G'$  y  $G''$  ( $G' > G''$ ), fueron de 8.35 y 7.10 min para los geles de DDGAX y DDGAXP, respectivamente. El valor de  $t_g$  indica el punto de transición sol/gel y en este punto  $G' = G''$  (Doublier & Cuvelier, 1996). El espectro mecánico de los geles de DDGAX y DDGAXP (Figura 7) después de 1 h de gelificación mostró un comportamiento típico para un material viscoelástico, con una  $G'$  independiente de la frecuencia y una  $G''$  mucho menor que la  $G'$  y dependiente de la frecuencia (Ross-Murphy & Shatwell, 1993). Comportamientos similares han sido observados para geles de AX de maíz en presencia de proteínas como ovoalbúmina, insulina y  $\beta$ -lactoglobulina (Berlanga-Reyes et al., 2009b; Carvajal-Millan et al., 2006).



**Figura 6.** Cinética reológica de soluciones al 2% (p/v) de DDGAX y DDGAXP durante la gelificación inducida por lacasa. Mediciones reológicas realizadas a 25°C, 0.25 Hz y 5% de deformación.

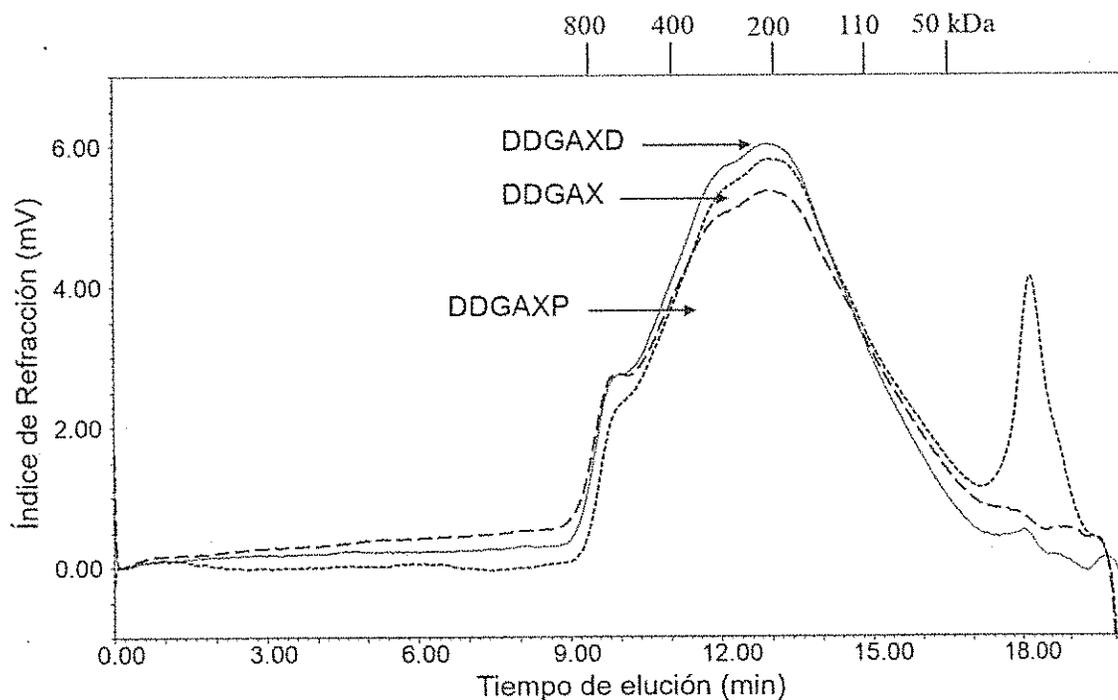


**Figura 7.** Espectro mecánico de geles de DDGAX y DDGAXP al 2% (p/v). Mediciones reológicas realizadas después de 1 h de gelificación a 25°C y 5 % de deformación.

#### V.4.6. Distribución de Peso Molecular de DDGAXD y DDGAXP

Para llevar a cabo una comparación de las características reológicas de los AX, los DDGAX fueron sometidos a las mismas condiciones de diálisis que los DDGAXP, obteniendo a los DDGAX dializados (DDGAXD). En la Figura 8 se muestra la comparación entre los perfiles de elución obtenidos para DDGAX, DDGAXD y DDGAXP. Las distribuciones de peso molecular para DDGAXD y DDGAXP resultaron muy similares entre sí, pero diferentes a la de DDGAX que mostró una segunda población de bajo peso molecular (tiempo de retención entre 17-19 min). Esta diferencia puede deberse al tratamiento de diálisis al que fueron sometidos los DDGAXD y DDGAXP, permitiendo su purificación y obteniendo una distribución de pesos moleculares más homogénea. Los DDGAXD presentaron un perfil de elución con un pico mayoritario de ~191 kDa (tiempo de retención 13.1 min), mientras que los DDGAXP uno de ~204 kDa (tiempo de

retención 13 min). Resultados similares han sido obtenidos previamente para AX de DDGS y pericarpio de maíz (Fierro-Islas, 2014; Martínez-López et al., 2013) Lo anterior indica que el tratamiento con proteasa no afectó la distribución de peso molecular de los AX, conservando su pico mayoritario.



**Figura 8.** Perfil de elución de exclusión molecular por HPLC de DDGAX, DDGAXD y DDGAXP. Los pesos moleculares de los pululanos utilizados como marcadores (kDa) para la calibración se muestran en la parte superior de la figura.

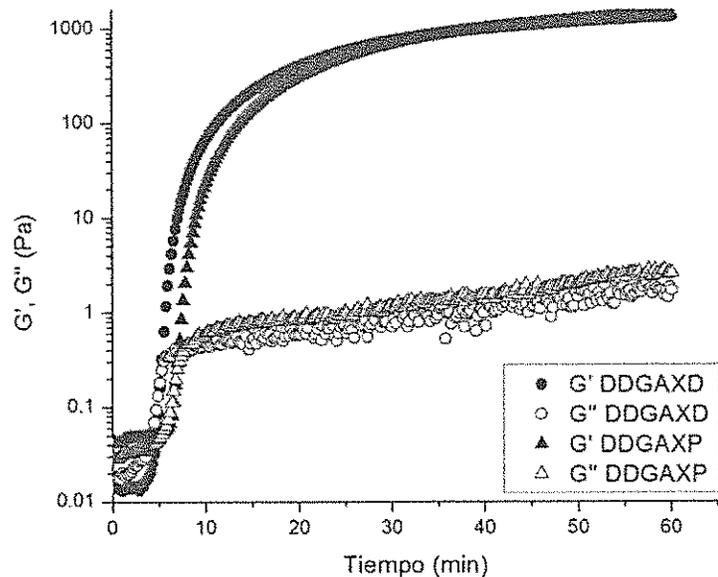
#### V.4.7. Características Viscoelásticas de DDGAXD y DDGAXP

La formación de los geles de DDGAXD y DDGAXP fueron seguidos mediante reología de baja deformación. Para ambas muestras, los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y pérdida ( $G''$ ) contra el tiempo presentaron un incremento al inicio, seguido por una región de estabilidad o plateau (Figura 9). Al final del proceso de gelificación (1 h), los valores de  $G'$  y  $G''$  para DDGAXD fueron

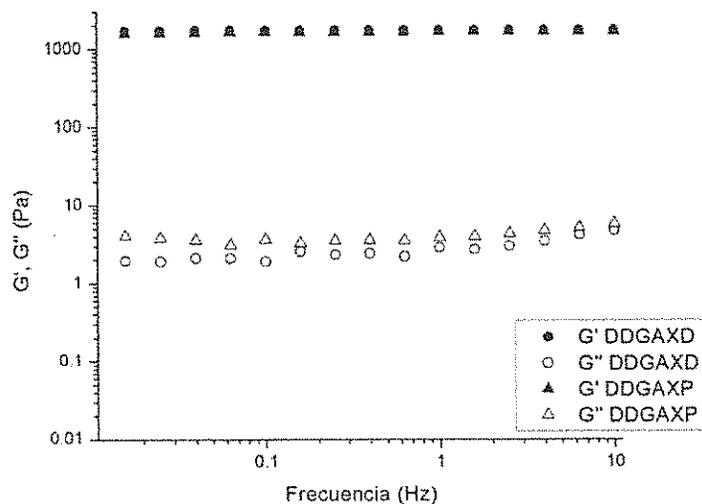
1474 ± 121 y 1.86 ± 0.44 Pa, respectivamente. El tratamiento con proteasas no afectó significativamente los valores finales de elasticidad ( $G'$ ) y viscosidad ( $G''$ ) en DDGAXP, los cuales fueron de 1338 ± 98 Pa y 1.56 ± 0.91 Pa, respectivamente. Lo anterior indica que la reducción del 54% en el contenido de proteína en los DDGAX, no influye en la gelificación. Resultados similares han sido observados en geles de AX de maíz atrapando proteínas (insulina, y  $\beta$ -lactoglobulina y albúmina de suero bovino) (Berlanga-Reyes et al., 2009b; Vansteenkiste et al., 2004). En el estudio de Berlanga-Reyes et al. (2009b), los valores de  $G'$  y  $G''$  fueron de 8.6 y 0.3 Pa, para los AX sin proteína, y variaron de 7.8 a 8.8 Pa y de 0.26 a 0.32 Pa, para los geles de AX con insulina y  $\beta$ -lactoglobulina, respectivamente.

El tratamiento con proteasas no afectó el contenido de AF, el cual fue de 6.39 ± 0.51 y 6.03 ± 0.36  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de AX para DDGAXD y DDGAXP, respectivamente. En geles de AX adicionados con diferentes concentraciones de BSA se obtuvo un comportamiento similar al comparar el control (AX + lacasa) y la muestra (AX + BSA) y observar que después de diferentes tiempos de reacción los cambios en el contenido de AF y de dehidrómeros de AF fueron similares (Figuroa-Espinoza et al., 1999a)

Los tiempos de gelificación ( $t_g$ ) obtenidos para DDGAXD y DDGAXP fueron de 5.43 y 6.87 min, respectivamente. En este punto  $G' = G''$  y es el momento en el cual se da la transición sol/gel (Doublier & Cuvelier, 1996). La Figura 10 muestra el espectro mecánico para DDGAXD y DDGAXP después de 1 h de gelificación. Ambas muestras presentaron un comportamiento característico de un material viscoelástico, observando una  $G'$  independiente de la frecuencia y una  $G''$  con un valor menor que la  $G'$  y dependiente de la frecuencia (Ross-Murphy & Shatwell, 1993). Resultados similares han sido observados para geles de AX de maíz en presencia de proteínas como ovoalbúmina, insulina y  $\beta$ -lactoglobulina (Berlanga-Reyes et al., 2009b; Carvajal-Millan et al., 2006).



**Figura 9.** Cinética reológica de soluciones al 2% (p/v) de DDGAXD y DDGAXP durante la gelificación inducida por lacasa. Mediciones reológicas realizadas a 25°C, 0.25 Hz y 5% de deformación.



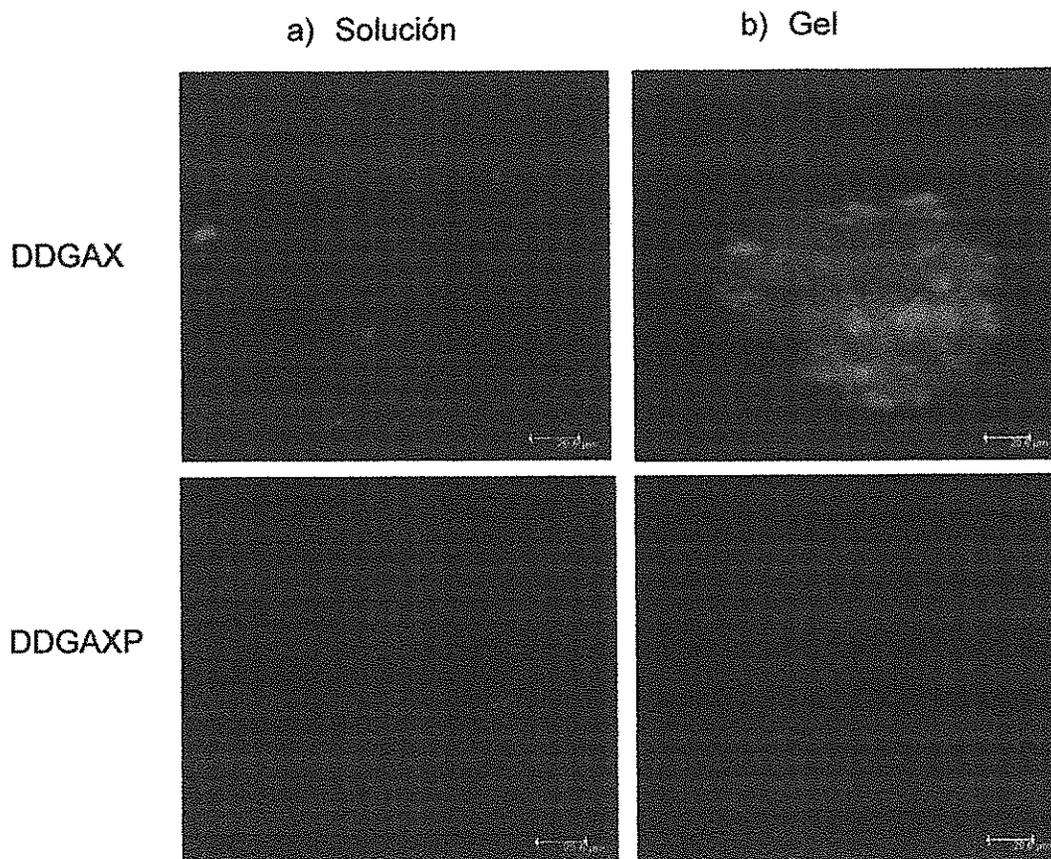
**Figura 10.** Espectro mecánico de geles de DDGAXD y DDGAXP al 2% (p/v). Mediciones reológicas realizadas después de 1 h de gelificación a 25°C y 5 % de deformación.

#### **V.4.8. Distribución de Proteína en Soluciones y Geles de DDGAX y DDGAXP**

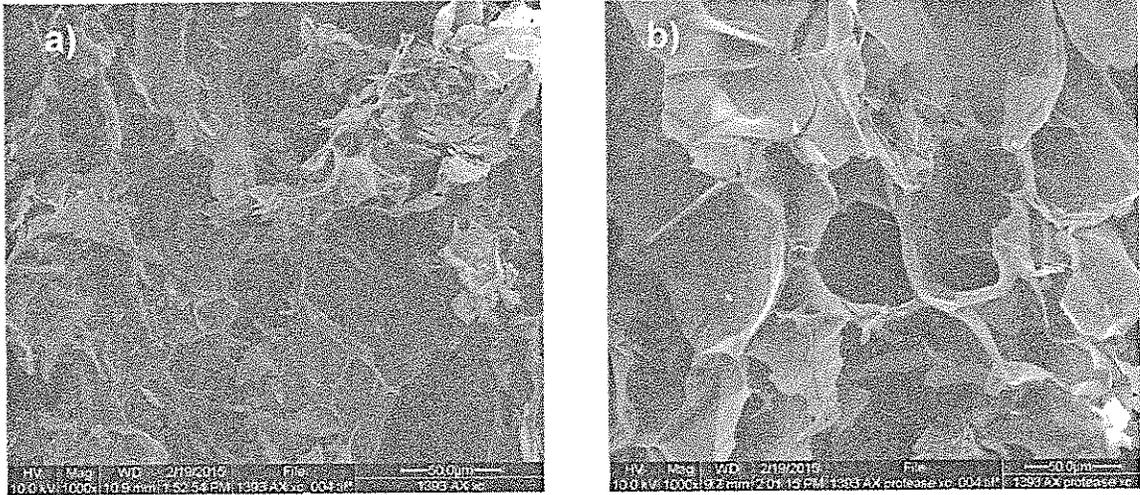
Con la finalidad de investigar cómo se encuentra distribuida la proteína a través de la red de AX, las soluciones y los geles de DDGAX y DDGAXP al 2% (p/v) fueron analizadas mediante microscopía confocal de barrido láser (CLSM). En la Figura 11 se muestran las micrografías de las soluciones y geles. La proteína aparece en color rojo brillante debido a que el marcador fluorescente, rodamina B isotiocianato, se absorbe en las proteínas (Berlanga-Reyes et al., 2014). El tamaño y cantidad de estas zonas brillantes, que indican la presencia de proteína, disminuyó en la solución y el gel de DDGAXP. En la solución y el gel de DDGAX, los agregados de proteína no presentaron una distribución homogénea. Un fenómeno opuesto se observó en la solución y el gel de DDGAXP, mostrando una distribución más homogénea de la proteína, lo cual se evidencia por la naturaleza difusa de la respuesta observada en la Figura 11.

#### **V.4.9. Estructura de Geles Liofilizados de DDGAX y DDGAXP**

La sección transversal de la estructura de los geles liofilizados de DDGAX y DDGAXP fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (Figura 12). La red del gel de DDGAX presentó una estructura heterogénea y puede compararse con la estructura de un panal de abeja irregular. Resultados similares han sido reportados para geles de maíz y trigo (Martínez-López et al., 2013; Morales-Ortega et al., 2013). El gel de DDGAXP (Figura 12b) presentó una estructura más homogénea y compacta en comparación con el gel de DDGAX (Figura 12a), lo cual puede ser atribuido a la purificación y eliminación de proteína en el polisacárido, generando una mejora en el entrecruzamiento de las cadenas y promoviendo la formación de una estructura más definida. El gel de DDGAXP mostró túneles bien definidos, mientras que el gel de DDGAX presentó estructuras en formas de hojuelas rígidas.



**Figura 11.** Observaciones por microscopía confocal de barrido láser (CLSM) de DDGAX y DDGAXP en a) solución al 2% (p/v) y b) gel al 2% (p/v). Se utilizó rodamina B isotiocinonato (RITC) al 0.02% (p/v) para teñir la proteína. Las zonas brillantes corresponden a la proteína (escala = 20.6  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 12.** Observaciones por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los geles liofilizados al 2% (p/v) de a) DDGAX y b) DDGAXP. Magnificación a 1000x.

## V.5. Conclusiones

Los AX con un alto contenido de ácido ferúlico y capacidad de gelificación pueden recuperarse a partir de DDGS, un residuo de la molienda seca del grano para la producción de bioetanol. La purificación y disminución en el contenido de proteína modificó las características microestructurales de los geles. Este resultado sugiere que la proteína está causando un efecto estérico, y la eliminación parcial de dicha proteína mejora el entrecruzamiento entre las cadenas del polisacárido. Además, las observaciones en CLSM mostraron que la eliminación parcial de la proteína promueve la continuidad y homogeneidad en la red del polisacárido. Las observaciones en SEM indicaron que la reducción en el contenido de proteína lleva a mejorar la homogeneidad en la estructura del gel. La disminución de la proteína no afectó las características reológicas de los geles formados. Así, es claro que la fracción proteica asociada al AX tiene un impacto en las características microestructurales de los geles formados de AX, y la reducción del contenido de proteína no influye en las propiedades del gel.

## VI. ENLACE COVALENTE CARBOHIDRATO-AMINOÁCIDO EN LA ASOCIACIÓN ARABINOXILANO-PROTEÍNA

### VI.1. Resumen

El propósito de este estudio fue investigar si la proteína asociada al arabinoxilano (DDGAXD) está unida a la molécula mediante el enlace O-glicosídico carbohidrato-aminoácido. La proteína asociada a DDGAX fue estudiada mediante electroforesis SDS-PAGE y presentó un rango de peso molecular de 6-14 kDa. El análisis de espectrometría de masas de la proteína de DDGAX permitió obtener una secuencia parcial de siete aminoácidos: alanina, treonina, triptófano, ácido glutámico, glicina, ácido glutámico y arginina (ATWEGER). La enzima O-glicosidasa puede remover la parte proteica unida a DDGAXD, lo cual sugiere que esta fracción se encuentra unida covalentemente a DDGAXD mediante los aminoácidos serina y/o treonina. Los aminoácidos más abundantes en la proteína de DDGAXD fueron histidina, ácido aspártico y treonina. Los resultados indican que la proteína asociada a DDGAXD presenta un rango de peso molecular cercano al reportado para otras proteínas de maíz asociadas a AX y que se encuentra unida mediante un enlace covalente al carbohidrato.

## VI.2. Introducción

Los granos secos de la destilería con solubles (DDGS) son uno de los subproductos principales de la molienda seca del maíz durante la producción del bioetanol. La fibra, producida en grandes cantidades, corresponde a la fracción mayoritaria de este subproducto. En ese sentido, los arabinoxilanos (AX) son el componente mayoritario de la fibra dietaria de cereales tales como maíz, trigo, centeno y arroz, entre otros (Izydorczyk & Biliaderis, 2007). Por ello, los DDGS pueden ser un recurso para la obtención potencial de AX ferulados.

Los AX son hemicelulosas constituidas principalmente por xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y ácido glucurónico; además, se ha reportado que presentan cierto porcentaje de proteína asociada que varía dependiendo de la fuente (1-8.5%) (Yadav et al., 2011). Su estructura consiste en una cadena lineal de xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4), a las cuales se unen residuos de arabinosa. Algunos residuos de arabinosa pueden estar unidos a residuos de ácido ferúlico (AF) en posición O-3 y/o O-2 (Izydorczyk & Biliaderis, 2007).

Una de las principales propiedades de los AX es su capacidad de gelificación mediante el acoplamiento covalente oxidativo (químico o enzimático) del AF (Izydorczyk & Biliaderis, 2007). Los geles que forman los AX presentan propiedades muy interesantes como sabor y olor neutro, alta capacidad de absorción de agua, resistencia a temperatura y pH, ausencia de susceptibilidad a la fuerza iónica y capacidad para formar estructuras meso y macroporosas (Izydorczyk & Biliaderis, 1995). Las propiedades de los geles dependen de las características estructurales de la molécula (peso molecular, contenido de AF, proporción A/X, entre otros) (Izydorczyk & Biliaderis, 2007). Una característica estructural que puede ser de importancia en la gelificación y no ha sido ampliamente estudiada es la proteína asociada al AX.

Después de la utilización de tratamientos con proteasas en los AX, cierto contenido de proteína permanece en el polisacárido. En estudios previos, el uso de pronasas ha disminuido el porcentaje de proteína hasta un 0.4-4.2 % en AX

de centeno y trigo (Ebringerova, 1994; Morales-Ortega et al., 2013; Saulnier et al., 1995a). A pesar de ello, no existen reportes en los que haya sido posible eliminar la proteína en su totalidad. Es bien sabido que la proteína asociada al AX juega un papel muy importante en sus propiedades emulsificantes (Yadav et., 2011). Sin embargo, el efecto que podría tener la eliminación de dicha proteína en la gelificación no ha sido estudiado.

Hasta el momento, no se conoce cómo es que la proteína se encuentra unida al AX. La exposición de los AX a condiciones alcalinas durante su extracción y a los tratamientos con proteasas no eliminan la proteína completamente. Investigaciones previas sugieren que la asociación entre el AX y la proteína involucra un enlace de tipo covalente (Adams et al., 2003; Yadav et al., 2011). En ese sentido, se han propuesto dos vías por las cuales se sugiere que la proteína podría estar unida al polisacárido. La primera sugiere una unión covalente entre AF-Tyr. Piber y Koehler (2005) detectaron la presencia de dicho entrecruzamiento entre las proteínas y el AF de los AX en harinas de trigo y centeno, pero no lograron identificar tal estructura. La otra propuesta implica una unión covalente carbohidrato-aminoácido, similar a la que se sugiere para las arabinogalactanas proteicas (AGP's) mediante un enlace de tipo O-glicosídico entre los aminoácidos Hyp y Ser con la galactosa (Mahendran et al., 2008). Sin embargo, este tipo de enlace no ha sido identificado en la asociación AX-proteína.

Por lo anterior, en el presente estudio los DDGAXD fueron sometidos a un tratamiento enzimático para investigar si el enlace O-glicosídico carbohidrato-aminoácido está presente en la asociación AX-proteína.

## VI.3. Materiales y Métodos

### VI.3.1. Materiales

Los DDGAX y DDGAXD utilizados se obtuvieron y caracterizaron de acuerdo con lo descrito en el capítulo anterior. Los DDGAX presentaron una pureza del 64% (p/p), una relación A/X de 1.08, una distribución de peso molecular de 209 kDa, un contenido de AF de 6.05 µg/mg, un contenido de proteína del 8.2% y una viscosidad intrínseca de 292 g/mL. Los DDGAXD presentaron una pureza del 76% (p/p), una relación A/X de 1.08, una distribución de peso molecular de 191 kDa y un contenido de AF de 6.3 µg/mg. La enzima lacasa (benzenediol: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) de *Trametes versicolor*, la proteasa tipo XIV (EC 232-909-5) de *Streptomyces griseus*, la proteína α-lactoalbúmina, así como el kit de deglicosilación proteico (EDEGLY) y el resto de los productos químicos utilizados fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). La enzima tripsina fue adquirida en Promega Corporation (Promega, Madison, WI).

### VI.3.2. Métodos

VI.3.2.1. Deglicosilación de DDGAX con ácido trifluorometanosulfónico (TFMS). La deglicosilación de DDGAX fue de acuerdo con la metodología reportada por Yadav et al. (2011). Los DDGAX fueron secados en una estufa de vacío durante toda la noche previo a la hidrólisis. La muestra de DDGAX (20 mg) fue colocada en un tubo con tapa y se le adicionó 1 mL de una mezcla de una solución de TFMS/Tolueno (90/10). Se incubó durante 4 h en un baño de etanol/CO<sub>2</sub> (-20°C) agitando ligeramente cada hora. La reacción fue neutralizada con 1 mL de piridina/metanol/agua (3:1:1) e incubada durante 15 min a 0°C. Enseguida se ajustó el pH a 5-6 con bicarbonato de amonio (5% p/v). La solución neutralizada fue aplicada a un cartucho de extracción de fase sólida C18 (Michrom

Bioresources, Inc., Auburn, CA). La proteína adsorbida por la fase estacionaria fue eluida con una mezcla de una solución de acetonitrilo/agua (1:1) conteniendo 0.1% de ácido trifluoroacético. La solución de proteína fue evaporada bajo flujo de nitrógeno a 25°C y congelada hasta su análisis.

VI.3.2.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteína de DDGAX deglicosilada usando TFMS. La proteína aislada de los DDGAX fue analizada por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La electroforesis se llevó a cabo en el equipo electroforético Pharmacia Phast System (Piscataway, NJ) y se utilizaron geles de poliacrilamida al 20% (phast gel). Las muestras de proteína fueron solubilizadas en 50 µL de un sistema solvente (10 mM Tris, 1 mM EDTA y 2.5% SDS, pH 8.0). Se inyectaron 128 µg de la proteína de DDGAX en cada uno de los pozos. Los geles fueron teñidos (0.2% p/v) con el colorante Coomassie R350. Se utilizó el estándar de pesos moleculares de SeeBlue Plus2 con un rango de 3-250 kDa (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) (Yadav et al., 2011).

VI.3.2.3. Digestión con enzima tripsina de proteína de DDGAX. La digestión de la proteína se hizo con tripsina (Promega, Madison, WI), de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor. Los péptidos fueron concentrados y purificados usando puntas de resina C18 (Zip Tip, Millipore Corp, Billerica, MA) mediante la extracción con 5 µL de una solución de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico, 5 mg/mL en acetonitrilo/agua (1:1), conteniendo 0.1% de ácido trifluoroacético (solución matriz) y colocados (1 µL) en un placa de acero inoxidable para su análisis en espectrometría de masas (Yadav et al., 2011).

VI.3.2.4. Espectrometría de masas. Los péptidos fueron analizados con un espectrómetro de ionización/desorción mediante láser asistida por matriz

acoplada a un analizador de tiempo de vuelo para la medición de los iones seleccionados (MALDI-TOF/TOF), con un Analizador Proteómico 4700 (Applied Biosystems, Framingham, MA). El instrumento fue operado en el modo de reflectron positivo, con un promedio de 1000 espectros en el rango de masa de 800 a 4000 Da en el modo MS y 2000 en el modo MS/MS. La conversión de TOF a masa (Da) para los iones monoisotópicos  $[M + H]^+$  se basó en la calibración del instrumento con un kit estándar de calibración (Applied Biosystems) (Yadav et al., 2011).

VI.3.2.5. Tratamiento con enzima O-glicosidasa de DDGAXD. El tratamiento con la enzima O-glicosidasa se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por el proveedor. A los DDGAXD disueltos en agua deionizada, se les adicionó una solución reguladora de fosfato de sodio (250 mM, pH 5) y la enzima, y se incubó a 37 °C durante 5 días. La actividad de la enzima fue investigada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Rodríguez-Martin, 2009). La electroforesis se llevó a cabo en el equipo electroforético Pharmacia Phast System (Piscataway, NJ) y se utilizaron geles de poliacrilamida del 10-15% (phast gel). Las muestras de proteína fueron solubilizadas en un sistema solvente (125 mM Tris-HCl, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 4% SDS, 0.05% azul de bromofenol). Se inyectaron 8  $\mu$ g de proteína de DDGAXD en cada uno de los pozos. Los geles fueron teñidos con el colorante Oriole Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad Laboratories). Se utilizaron los estándares de pesos moleculares de Precision Plus Protein Standards Unstained con un rango de 10-250 kDa (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

VI.3.2.6. Composición de aminoácidos de DDGAXD. El perfil de aminoácidos de la proteína de DDGAXD fue obtenido mediante HPLC de acuerdo con la metodología descrita por (Vásquez-Ortiz et al., 1995). Las muestras fueron hidrolizadas usando HCl 6 M a 150 °C por 6 h. Después de enfriar y evaporar,

las muestras hidrolizadas fueron resuspendidas en búffer y ajustadas a un pH de 2.2 previo a su análisis. Se utilizó un HPLC (Hewlett Packard Model 1100) equipado con una columna Microsorb RP-C18 (10 cm x 4.6 mm ID) acoplado a un detector de fluorescencia. Los aminoácidos secundarios (prolina e hidroxiprolina) fueron determinados mediante el análisis de una mezcla de 125  $\mu$ L de muestra con 500  $\mu$ L de búffer de borato y 250  $\mu$ L de 4-cloro-7-nitrobenzofurano (NBD-Cl). La mezcla fue calentada a 60 °C durante 5 min y la reacción fue terminada con 50  $\mu$ L de HCl 1 M. Como aminoácidos estándar se utilizó el Estándar H de aminoácidos (Thermo Scientific Pierce).

VI.3.2.7. Análisis Estadístico. Las determinaciones químicas se realizaron por triplicado con un índice de confiabilidad del 95%. La cuantificación de aminoácidos se realizó por duplicado. Los valores son expresados en valores de medias. Se utilizó el programa estadístico NCSS.

## VI.4. Resultados y Discusión

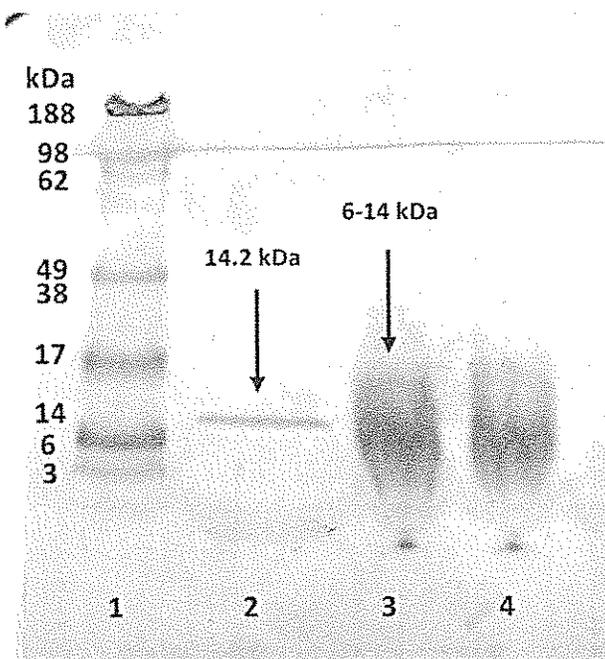
### VI.4.1. Deglicosilación de DDGAX usando TFMS y Electroforesis SDS-PAGE

Con la finalidad de estudiar la proteína asociada a los DDGAX, estos fueron sometidos a un tratamiento de deglicosilación usando el ácido TFMS para eliminar la parte carbohidrato de la molécula. La proteína asociada a DDGAX obtenida después de la deglicosilación y purificación fue estudiada mediante electroforesis (SDS-PAGE). En la Figura 13 se muestra el perfil electroforético de la proteína de DDGAX (carril 3) y de la  $\alpha$ -lactoalbúmina comercial (carril 2), utilizada para fines de comparación. La proteína de DDGAX presentó una banda en el rango de ~ 6-14 kDa (carril 3). Esta banda es diferente pero con un rango cercano a la banda de 22 kDa encontrada por Yadav et al. (2011) para la proteína de goma de fibra de maíz. Esta diferencia en el peso molecular puede deberse a las condiciones utilizadas en la electroforesis y a la fuente de los AX. En los carriles 2 y 4 se encuentran las bandas correspondientes a la  $\alpha$ -lactoalbúmina comercial (14 kDa) y a una mezcla de la proteína de DDGAX +  $\alpha$ -lactoalbúmina comercial, respectivamente.

### VI.4.2. Digestión de la Proteína de DDGAX con la Enzima Tripsina y Análisis de Espectrometría de Masas

Después de la digestión con tripsina de la proteína de DDGAX, los péptidos purificados fueron analizados mediante espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF). La enzima tripsina corta selectivamente a las proteínas después de los residuos de lisina (K) y arginina (R). El análisis de espectrometría permitió obtener el espectro de masas (MS) y enseguida seleccionar el ion más abundante para obtener su espectro de fragmentación (MS/MS). El MS proporciona la masa

de los péptidos digeridos y el MS/MS provee información específica de la fragmentación para elucidar la secuencia del péptido seleccionado (Yadav et al., 2011).



**Figura 13.** Electroforesis SDS-PAGE de proteína obtenida de DDGAX después de deglicosilación y de  $\alpha$ -lactoalbúmina. Carril 1: Estándar de pesos moleculares; Carril 2:  $\alpha$ -lactoalbúmina; Carril 3: proteína de DDGAX; Carril 4: Proteínas de DDGAX +  $\alpha$ -lactoalbúmina.

El MS de los péptidos de la proteína de DDGAX (Figura 14) muestra las masas de los iones, siendo el 848.38 el más abundante, por lo que fue seleccionado para la generación de su MS/MS. La Figura 15 muestra el espectro de fragmentación para el ion seleccionado (848.38). Este fue analizado con el programa PEAKS Studio 5.2 (Bioinformatics Solutions Inc. Waterloo, ON, Canadá) y generó una secuencia parcial de siete aminoácidos (ATWEGER). Para fines prácticos, los aminoácidos fueron abreviados en base al código estándar de nomenclatura IUPAC-IUB (IUPAC-IUB, 1988). Enseguida, la secuencia parcial obtenida fue ingresada a la Base de Datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) para buscar proteínas coincidentes,

resultando coincidente en cinco aminoácidos (WEGER) con la proteína hipotética de maíz (ZEAMMB73\_187074 [Zea mays] gb|AFW68221.1|). La calidad de los espectros MS/MS depende de la habilidad del péptido para fragmentarse y de su concentración, por lo que es común observar que pocos péptidos produzcan buenos espectros (Yadav et al., 2011).

La proteína de DDGAX presentó un rango de peso molecular (6-14 kDa) cercano al de la proteína hipotética encontrada en la base de datos (9.7 kDa), y al de la proteína de goma de fibra de maíz (22 kDa) (Yadav et al., 2011). Los aminoácidos Ala, Val, Pro, Gly, Gln, Leu, Thr, Try, e Hyp han sido reportados como los más abundantes en proteínas de AX de maíz (Cirre et al., 2014; Saulnier et al., 1995a; Yadav et al., 2011) y a Gly, Ser, Ala, Arg como los más abundantes en la proteína de AX de centeno (Ebringerova et al., 1994). En el presente estudio, la secuencia parcial encontrada corresponde a un pequeño fragmento de la proteína completa de DDGAX. Por lo anterior, el resto de la secuencia puede contener otros aminoácidos incluyendo los que han sido reportados como los más abundantes en las proteínas de AX.

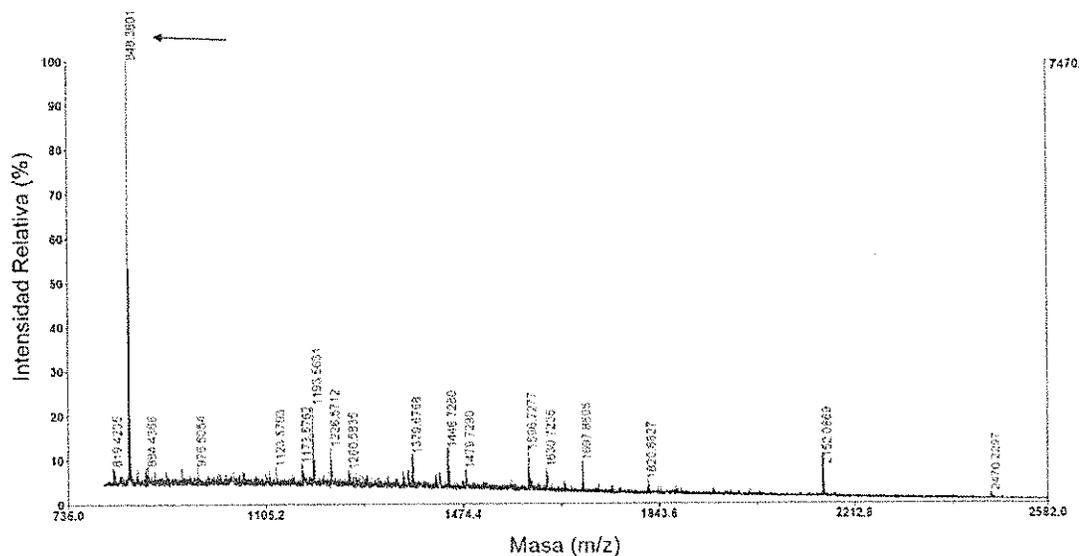


Figura 14. Espectro de masas MALDI TOF/TOF de péptidos de proteína de DDGAX digerida con tripsina.

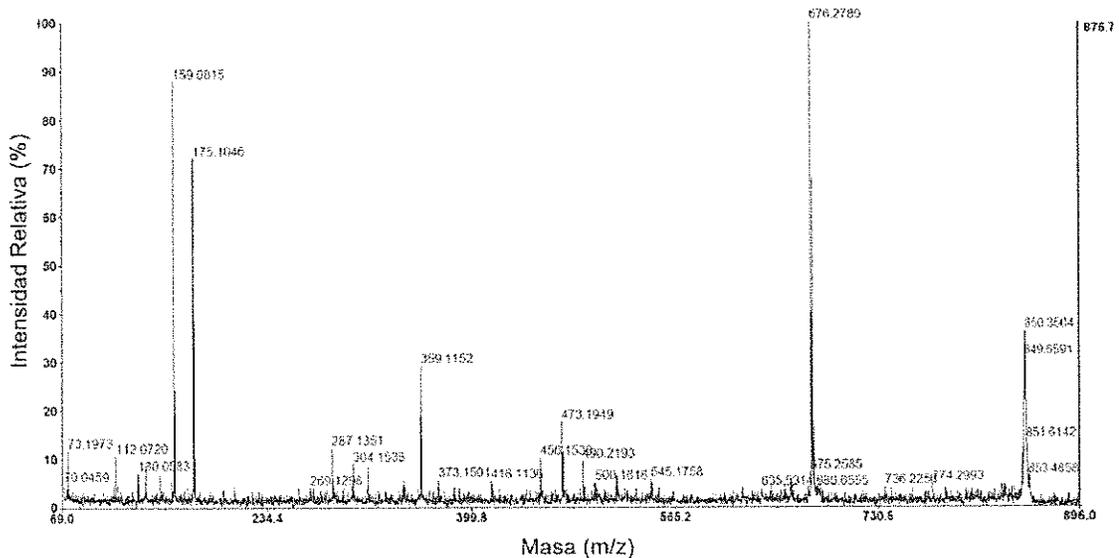


Figura 15. Espectro de fragmentación de ion precursor 848.3801.

#### VI.4.3. Deglicosilación de DDGAXD con Enzima O-glicosidasa y Electroforesis de proteína de DDGAXD

La proteína de DDGAXD fue estudiada mediante electroforesis SDS-PAGE después de someterla a una digestión con la enzima O-glicosidasa. La Figura 16 muestra la banda correspondiente a la proteína de DDGAXD ubicada entre ~ 10-15 kDa (Carril 2 y 3). Este rango de peso molecular es similar al obtenido en la proteína deglicosilada con TFMS (~ 6-14 kDa) (Figura 10), lo cual indica que corresponde a la misma fracción proteica previamente detectada. En un estudio realizado en goma arábiga, la deglicosilación con HF de la goma reveló mediante un análisis electroforético, dos posibles regiones polipeptídicas. Se observó una banda difusa de alto peso molecular de ~ 30 kDa que podría estar parcialmente glicosilada y una banda más pequeña de ~ 5 kDa, sugiriendo dos polipéptidos de ~ 250 y ~ 50 aminoácidos, respectivamente (Mahendran et al.,

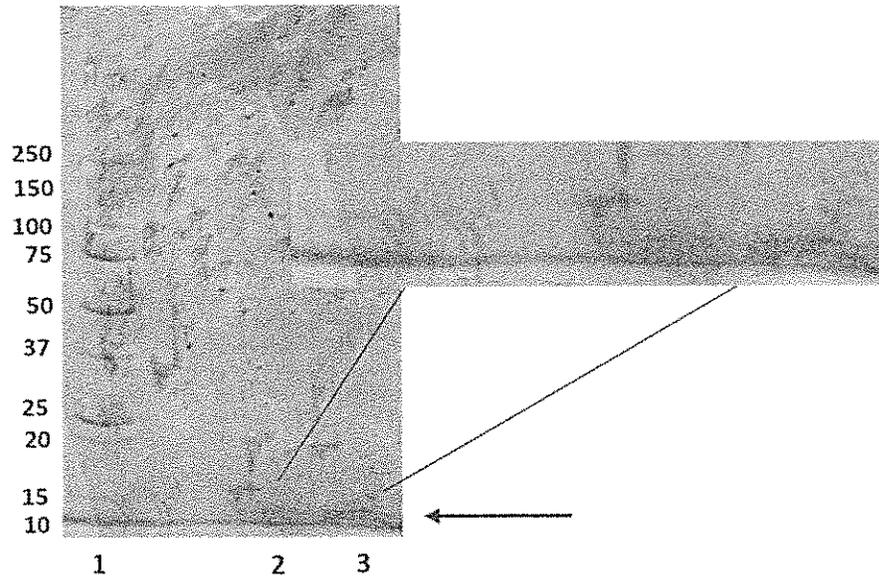
2008). Por lo anterior, es posible que la fracción proteica asociada a DDGAXD sea de naturaleza polipeptídica. Cabe mencionar que se ha propuesto una estructura de cadenas de AX covalentemente unidas a una región proteica, similar a la de las AGP's (Ebringerova et al., 1994); sin embargo, esta no ha sido identificada en los AX.

La enzima O-glicosidasa utilizada en el presente trabajo corta los enlaces entre Gal- $\beta$ -(1-3)-GalNAc y los aminoácidos Ser/Thr (Figura 17) (Bhavanandan y Umemoto, 1976). Diversos estudios han propuesto un enlace de naturaleza covalente en la asociación entre el AX y la proteína (Ebringerova et al., 1994; Saulnier et al., 1995a; Adams et al., 2003; Yadav et al., 2011). Así mismo, se menciona que dicho enlace podría involucrar al aminoácido hidroxiprolina (Saulnier et al., 1995). En las AGP's, las fracciones polipeptídicas se encuentran unidas al carbohidrato mediante enlaces O-glicosídicos, que involucran a los aminoácidos Ser e Hyp (Akiyama et al., 1984; Mahendran et al., 2008). De igual manera, se ha sugerido la presencia de enlaces O-glicosídicos mediante lisina, hidroxilisina y/o enlaces N-glicosídicos (Mahendran et al., 2008). Con el presente estudio es posible confirmar que el enlace entre la fracción proteica y el AX es un enlace O-glicosídico de naturaleza covalente y se da entre los aminoácidos Ser/Thr y el carbohidrato.

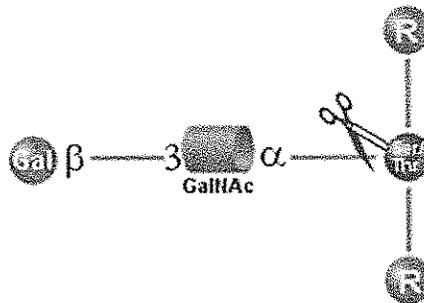
Se ha reportado que la estructura de los AX puede ser más compleja dependiendo de la fuente de donde se obtengan. En los AX de tejidos externos del grano, se ha identificado la presencia de residuos de galactosa, ácido glucurónico y ácido acético (Figura 18) (Saulnier et al., 2013). Sin embargo, hasta el momento no se ha identificado la presencia de azúcares aminados en la estructura de AX, por lo que es necesario otro tipo de estudios para confirmar este tipo de residuos en su estructura.

El presente trabajo confirma la presencia del enlace carbohidrato-aminoácido en la asociación del AX con la proteína. Aun así, no es posible asegurar que éste sea el único tipo de enlace presente en dicha asociación. Otra de las vías propuestas, es el entrecruzamiento covalente entre el AF y el

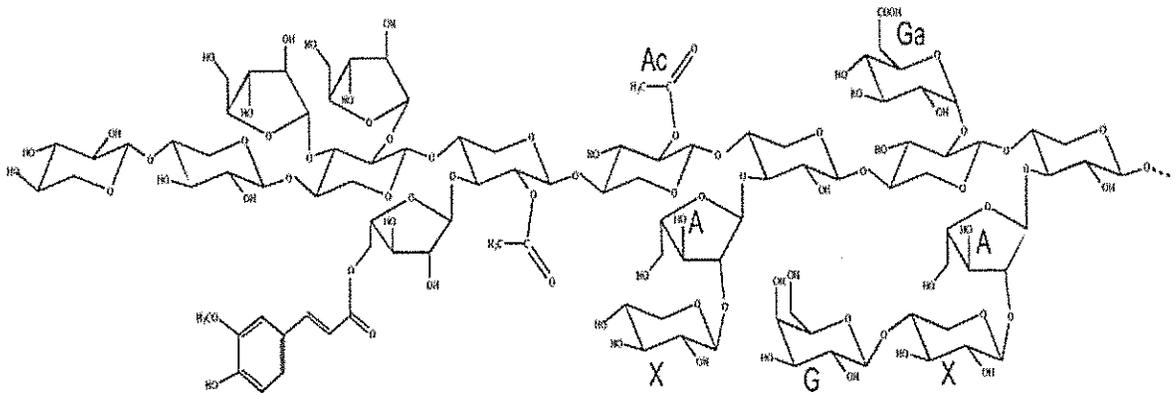
aminoácido Tyr (Piber y Koehler, 2005). Para ello, es necesario realizar otros estudios enfocados a este tipo de enlace que logren confirmarlo.



**Figura 16.** Electroforesis SDS-PAGE de proteína de DDGAXD obtenida después de la deglicosilación con O-glicosidasa.  
Carril 1: Estándar de pesos moleculares; Carril 2 y 3: Proteína de DDGAXD.



**Figura 17.** Esquema del sitio de corte de la enzima O-glicosidasa. Gal: galactosa; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Ser: serina; Thr: treonina.



**Figura 18.** Estructura de AX de pericarpio de granos de cereales. A: arabinosa; X: xilosa; G: galactosa; Ga: ácido glucurónico; Ac: ácido acético. Adaptada de: Saulnier et al. (2013).

#### VI.4.4. Perfil de aminoácidos de la proteína asociada a DDGAXD

En el Cuadro 3 se muestra el perfil de aminoácidos de la proteína de DDGAXD. Los aminoácidos más abundantes en DDGAXD fueron ácido aspártico, histidina y treonina. En la goma de fibra de maíz (CFG) se han identificado a prolina y glutamina como los de mayor proporción (Cirre et al., 2014). Para la proteína de AX de centeno, glicina y serina han sido reportados como los aminoácidos mayoritarios (Ebringerova et al., 1994). Por su parte, Saulnier et al. (1995a) encontraron abundancia de los aminoácidos prolina e hidroxiprolina en la proteína de AX de pericarpio de maíz.

A diferencia de las proteínas asociadas a AX de maíz reportadas por Cirre et al. (2014) y Saulnier et al. (1995a), en DDGAXD no fueron detectados (bajo las condiciones de hidrólisis previamente mencionadas) los aminoácidos secundarios prolina e hidroxiprolina. En AX de fuentes como el centeno se han detectado trazas de prolina y muy bajas concentraciones de hidroxiprolina

(Ebringerova et al., 1994). Los AX de maíz estudiados por Cirre et al. (2014) y Saulnier et al. (1995a) se obtuvieron directamente de pericarpio de maíz, mientras que los DDGAXD utilizados en el presente estudio provienen de un residuo de la producción de bioetanol (DDGS), el cual conlleva otros procesos, tales como la fermentación. Cabe mencionar además que DDGAXD fue dializado, por lo que la proteína remanente que no se encontrara unida covalentemente al polisacárido, pudo haber sido eliminada con dicho tratamiento o bien la diálisis pudo haber disminuido su concentración de tal manera que no lograran ser detectados durante el análisis. Así, las diferencias en la composición de aminoácidos pueden deberse tanto a la fuente de donde se obtiene el AX como al método de extracción utilizado para obtener al polisacárido.

Los aminoácidos cuantificados en el perfil de DDGAXD corresponden al 77.3% del contenido total de proteína en la molécula. Por lo que el porcentaje restante puede corresponder a los aminoácidos que no fueron cuantificados. Entre estos aminoácidos se encuentra el triptófano, del cual su presencia en la proteína puede confirmarse mediante la secuencia parcial de aminoácidos (ATWEGER) obtenida por espectrometría de masas. Así mismo, en base al resultado obtenido mediante la deglicosilación de DDGAXD con la enzima O-glicosidasa, no se descarta la posibilidad de que cierto porcentaje del nitrógeno total (8.24%) sea aportado por azúcares aminados que formen parte de la estructura del AX. Para ello, es necesario realizar la cuantificación de todos los aminoácidos, así como la utilización de otro tipo de análisis como la resonancia magnética nuclear para la identificación de azúcares aminados en la estructura del AX.

**Cuadro 3.** Contenido de aminoácidos (nmol/mg) de DDGAXD.

Aminoácido	DDGAXD
Ácido aspártico	51.28
A. glutámico	31.63
Serina	22.93
Histidina	54.69
Glicina	30.65
Treonina	47.73
Arginina	11.16
Alanina	23.61
Tirosina	30.54
Metionina	44.2
Valina	38.75
Fenilalanina	14.45
Isoleucina	22.41
Leucina	24.78
Lisina	27.8
Prolina	ND
Hidroxiprolina	ND
% Proteína	8.24

## VI.5. Conclusiones

La proteína asociada a DDGAX presentó un rango de peso molecular de 6-14 kDa, cercano al que presentan otras proteínas asociadas a los AX de maíz. Se obtuvo una secuencia parcial de siete aminoácidos (ATWEGER) de un fragmento de la proteína de DDGAX. Los aminoácidos más abundantes en la proteína asociada a DDGAXD fueron ácido aspártico, histidina y treonina. Se identificó la presencia de un enlace covalente de tipo O-glicosídico entre la proteína y el AX a través de serina y/o treonina.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). 1988. A one-letter notation for amino acid sequences. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 3(125):i–v.
- Adams, E. L., Kroon, P., Williamson, G., & Morris, V. J. 2003. Characterisation of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, 338(8):771–80.
- Agger, J., Viksø-Nielsen, A., & Meyer, A. S. 2010. Enzymatic xylose release from pretreated corn bran arabinoxylan: differential effects of deacetylation and deferuloylation on insoluble and soluble substrate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58:6141–6148.
- Akiyama, Y., Eda, S., & Kato, K. 1984. Gum arabic is a kind of arabinogalactan protein. *Agricultural and Biological Chemistry*. 48(1):235–237.
- Andrewartha, K. A., Phillips, D. R., & Stone, B. A. 1979. Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymically modified arabinoxylans. *Carbohydrate Research*. 77:191–204.
- AOAC. 1995. AOAC Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (16th ed.). AOAC International. Arlington, TX, USA.
- Berlanga-Reyes, C. M., Carvajal-Millán, E., Caire-Juvera, G., Rascón-chu, A., Marquez-Escalante, J. A., & Martínez-lópez, A. L. 2009a. Laccase induced maize bran arabinoxylan gels: Structural and rheological properties. *Food Science and Biotechnology*. 18(4):1027–1029.
- Berlanga-Reyes, C. M., Carvajal-Millan, E., Hicks, K. B., Yadav, M., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Toledo-Guillén, A. R., & Islas-Rubio, A. R. 2014. Protein/Arabinoxylans gels: Effect of mass ratio on the rheological, microstructural and diffusional characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*. 15:19106–19118.
- Berlanga-Reyes, C. M., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., Marquez-Escalante, J. A., & Martínez-López, A. L. 2009b. Maize

- arabinoxylan gels as protein delivery matrices. *Molecules*. 14(4):1475–1482.
- Bettge, A. D., & Morris, C. F. 2007. Oxidative gelation measurement and influence on soft wheat batter viscosity and end-use quality. *Cereal Chemistry*. 84(3):237–242.
- Bhavanandan V. P., & Umemoto, J. D. E. 1976. Characterization of an endo- $\alpha$ -N-acetyl galactosaminidase from *Diplococcus pneumoniae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 70:738–4510.
- Bunzel, M. 2010. Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers. *Phytochemistry Reviews*. 9:47–64.
- Carvajal-Millan, E., Guigliarelli, B., Belle, V., Rouau, X., & Micard, V. 2005a. Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels. *Carbohydrate Polymers*. 59:181–188.
- Carvajal-Millan, E., Guilbert, S., Doublier, J. L., & Micard, V. 2006. Arabinoxylan/protein gels: Structural, rheological and controlled release properties. *Food Hydrocolloids*. 20:53–61.
- Carvajal-Millán, E., Landillon, V., Morel, M. H., Rouau, X., Doublier, J. L., & Micard, V. 2005b. Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*. 6:309–317.
- Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J. A., Micard, V., Ponce, N., & Gardea, A. 2007. Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers*. 69:280–285.
- Chanliaud, E., Saulnier, L., & Thibault, J. F. 1995. Alkaline extraction and characterisation of heteroxylans from maize bran. *Journal of Cereal Science*. 21:195–203.
- Cirre, J., Al-Assaf, S., Phillips, G. O., Yadav, M. P., & Hicks, K. B. 2014. Improved emulsification performance of corn fibre gum following maturation treatment. *Food Hydrocolloids*. 35:122–128.
- Doublier, J. L., & Cuvelier, G. 1996. Gums and hydrocolloids: Functional aspects. En: A. C. Eliasson (Ed.), *Carbohydrates in food*, Marcel Dekker, New York, 283–318p.
- Du, C., Campbell, G. M., Misailidis, N., Mateos-Salvador, F., Sadhukhan, J., Mustafa, M., & Weightman, R. M. 2009. Evaluating the feasibility of commercial arabinoxylan production in the context of a wheat biorefinery principally producing ethanol. Part 1. Experimental studies of arabinoxylan

- extraction from wheat bran. *Chemical Engineering Research and Design*. 87:1232–1238.
- Ebringerova, A., Hromadkova, Z., & Berth, G. 1994. Structural and molecular properties of a water-soluble complex isolated from rye bran. *Carbohydrate Research*. 264:97–109.
- Fierro-Islas, J. M. 2014. Extracción, caracterización y gelificación de arabinoxilanos de residuos de la producción de bioetanol de maíz: Efecto del tiempo de extracción en las características reológicas y microestructurales de los geles. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora.
- Figuroa-Espinoza, M. ., Morel, M.-H., Surget, a, Asther, M., Moukha, S., Sigoillot, J.-C., & Rouau, X. 1999a. Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase. *Food Hydrocolloids*. 13(1):65–71.
- Figuroa-Espinoza, M. C., Morel, M. H., Surget, A., & Rouau, X. 1999b. Oxidative cross-linking of wheat arabinoxylans by manganese peroxidase . Comparison with laccase and horseradish peroxidase . Effect of cysteine and tyrosine on gelation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79:460–463.
- Fincher, G. B., & Stone, B. A. 1974. A water-soluble arabinogalactan– peptide from wheat endosperm. *Australian Journal of Biological Science*. 27:117–132.
- Fincher, G. B., & Stone, B. H. 1986. Cell walls and their components in cereal science and technology. En: Y. Pomeranz (Ed.), *Advances in cereal science and technology*. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN., 207–295p.
- Girhammar, U., & Nair, B. M. 1995. Rheological properties of water soluble non-starch polysaccharides from whole grain rye flour. *Food Hydrocolloids*. 9(2):133–140.
- Gruppen, H., Marseille, J. P., Voragen, A. G. J., & Hamer, R. J. 1990. On the large-scale isolation of water-insoluble cell wall material from wheat flour. *Cereal Chemistry*. 67(5):512–514.
- Hromádková, Z., Paulsen, B. S., Martin Polovka, M., Zuzana Kořst'álová, Z., & Ebringerová, A. 2012. Structural features of two heteroxylan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*. 93:22–30.

- Iravani, S., Fitchett, C. S., & Georget, D. M. R. 2011. Physical characterization of arabinoxylan powder and its hydrogel containing a methyl xanthine. *Carbohydrate Polymers*. 85:201–207.
- Izydorczyk, M., Biliaderis, C. G., & Bushuk, W. 1991. Comparison of the structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat-varieties. *Cereal Chemistry*. 68:139–144.
- Izydorczyk, M. S., & Dexter, J. E. 2008. Barley  $\beta$ -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products-- a Review. *Food Research International*. 41(9):850–868.
- Izydorczyk, M.S., & Biliaderis, C. G. 2007. Arabinoxylans: Technologically and nutritionally functional plant polysaccharides. En: Y. Pomeranz (Ed.), *Advances in cereal science and technology*. American Association of Cereal Chemistry, St. Paul, MN., 207–295p.
- Izydorczyk, M.S., Biliaderis, C. G. 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*. 28:33–48.
- Kale, M. S., Hamaker, B. R., & Campanella, O. H. 2013. Alkaline extraction conditions determine gelling properties of corn bran arabinoxylans. *Food Hydrocolloids*. 31:121–126.
- Kraemer, E. O. 1938. Molecular weight of celluloses and cellulose derivatives. *Industrial and Engineering Chemistry*. 30:1200–1203.
- Lapierre, C., Pollet, B., Ralet, M. C., & Saulnier, L. 2001. The phenolic fraction of maize bran: Evidence for lignin-heteroxylan association. *Phytochemistry*. 57:765–772.
- Lefebvre, J., & Doublier, J. L. 2005. Rheological behavior of polysaccharides. En: S. Dumitriu (Ed.), *Polysaccharides: Structural diversity and functional versatility* (2da ed.). Marcel Dekker, New York, 357–394 p.
- Mahendran, T., Williams, P. A., Phillips, G. O., Al-Assaf, S., & Baldwin, T. C. 2008. New Insights into the Structural Characteristics of the Arabinogalactan - Protein ( AGP ) Fraction of Gum Arabic. 56:9269–9276.
- Martínez-López, A. L., Carvajal-Millan, E., Miki-Yoshida, M., Alvarez-Contreras, L., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., López-Franco, Y. 2013. Arabinoxylan microspheres: Structural and textural characteristics. *Molecules*. 18:4640–4650.

- Mattinen, M.-L., Kruus, K., Buchert, J., Nielsen, J. H., Andersen, H. J., & Steffensen, C. L. 2005. Laccase-catalyzed polymerization of tyrosine-containing peptides. *The FEBS Journal*. 272(14):3640–50.
- Mead, D. J., & Fouss, R. M. 1942. Viscosities of solutions of polyvinyl chloride. *Journal of the American Chemical Society*. 64:277–282.
- Moore, A. M., & Hosney, R. C. 1990. Factors affecting the oxidative gelation of wheat water-solubles. *Cereal Chemistry*. 67(1):81–84.
- Morales-Ortega, A., Carvajal-Millan, E., López-Franco, Y., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Torres-Chavez, P., & Campa-Mada, A. 2013. Characterization of water extractable arabinoxylans from a spring wheat flour: rheological properties and microstructure. *Molecules*. 18(7):8417–28.
- Morita, S., Ito, T., & Hirano, S. 1974. A gel-forming polysaccharide containing ferulic acid in protein-free form present in an aqueous extract of wheat flour. *International Journal of Biochemistry*. 5:201–205.
- Neukom, H., & Markwalder, H. U. 1978. Oxidative gelation of wheat flour pentosans: A new way of cross-linking polymers. *Cereal Foods World*. 23:374–376.
- Neukom, H., Kündig, W., & Deuel, H. 1962. The soluble wheat flour pentosans. *Cereal Science*. 7:112–125.
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Lizardi, J., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J., Gardea, A., Martínez-López, A. L., & Guerrero, V. 2009. Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content. *Food Chemistry*. 115(4):1286–1290.
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J., Guerrero, V., & Salas-Muñoz, E. 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications. *Phytochemistry Reviews*. 9(1):111–120.
- Oudgenoeg, G., Hilhorst, R., Piersma, S. R., Boeriu, C. G., Gruppen, H., Hessing, M., Voragen, A. G. J., & Laane, C. 2001. Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine-containing peptide with ferulic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(5):2503–10.
- Piber, M., & Koehler, P. 2005. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(13):5276–84.

- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J. H., & Hatfield, R. D. 1994. Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. (23):3485.
- Rao, M. V. S. 1993. Viscosity of dilute to moderately concentrated polymer solutions. *Polymer*. 34:592–596.
- Rattan, O., Izydorczyk, M. S., & Biliaderis, C. G. 1994. Structure and rheological behaviour of arabinoxylans from canadian bread wheat flours. *Lebensm Wiss Technology*. 27:550–555.
- Rodriguez-Martin, A. 2009. Caracterización de proteínas con actividad antifúngica producidas por *Penicillium chrysogenum*. Tesis de Doctorado. Universidad de Extremadura. Cáceres, España.
- Ross-Murphy, S. B., & Shatwell, K. P. 1993. Polysaccharide strong and weak gels. *Biorheology*. 30:217–227.
- Rouau, X.; Chaynier, V.; Surget, A.; Gloux, D.; Barron, C.; Meudeu, E.; Montero, J.L.; & Criton, M. 2003. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry*. 63:899–903.
- Sárossy, Z., Tenkanen, M., Pitkänen, L., Bjerre, A., & Plackett, D. 2013. Extraction and chemical characterization of rye arabinoxylan and the effect of b-glucan on the mechanical and barrier properties of cast arabinoxylan films. *Food Hydrocolloids*. 30:206–216.
- Saulnier, L., Chanliaud, E., & Thibault, J. 1995a. Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydrate Polymers*. 26:279–287.
- Saulnier, L., Peneau, N., & Thibault, J. F. 1995b. Variability in grain extract viscosity and water-soluble arabinoxylan content in wheat. *Journal of Cereal Science*. 22:259–264.
- Saulnier, L., Sado, P. E., Branlard, G., Charmet, G., & Guillon, F. 2007. Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *Journal of Cereal Science*. 46(3):261–281.
- Saulnier, L., Guillon, F., Sado, P., Rouau, X. 2013. Plant Cell Wall Polysaccharides in Storage Organs: Xylans (Food Applications). En: J. Reedijk (Ed.), Elsevier Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering. Waltham, MA, Elsevier Inc., 1–32 p.
- Séné, C. F. B., McCann, M. C., Wilson, R. H., & Grinter, R. 1994. Fourier-Transform Raman and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. An

- investigation of five higher plant cell walls and their components. *Plant Physiology*. 106:1623–1631.
- Smith, M. M., & Hartley, R. D. 1983. Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydrate Research*. 118:65–80.
- Strahm, A., Amadó, R., & Neukom, H. 1981. Hydroxyproline-galactoside as a protein-polysaccharide linkage in a water soluble arabinogalactan-peptide from wheat endosperm. *Phytochemistry*. 20(5):1061–1063.
- Urias-Orona, V., Huerta-Oros, J., Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., & Gardea, A. A. 2010. Component analysis and free radicals scavenging activity of *Cicer arietinum* L. husk pectin. *Molecules*. 15:6948–6955.
- Van Laar, H., Tamminga, S., Williams, B. A., Verstegen, M. W., & Schols, H. 2002. Fermentation characteristics of polysaccharide fractions extracted from the cell walls of maize endosperm. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(12):1369–1375.
- Vansteenkiste, E., Babot, C., Rouau, X., & Micard, V. 2004. Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*. 18:557–564.
- Vásquez-Ortiz, F. A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I., & Hernández, G. 1995. High performance liquid chromatographic determination of free amino acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 18:2059–2068.
- Whistler, L., & Bemiller, J. N. 1956. Hydrolysis components from methylated corn fiber gum. *Journal of American Chemical Society*. 78:1163–1165.
- Yadav, M. P., Cooke, P., Johnston, D. B., & Hicks, K. B. 2010. Importance of protein-rich components in emulsifying properties of corn fiber gum. *Cereal Chemistry*. 87(2):89–94.
- Yadav, M. P., Fishman, M. L., Chau, H. K., Johnston, D. B., & Hicks, K. B. 2007a. Molecular characteristics of corn fiber gum and their influence on CFG emulsifying properties. *Cereal Chemistry*. 84(2):175–180.
- Yadav, M. P., Johnston, D. B., & Hicks, K. B. 2007b. Structural characterization of corn fiber gums from coarse and fine fiber and a study of their emulsifying properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:6366–6371.

- Yadav, M. P., Johnston, D. B., & Hicks, K. B. 2009. Corn fiber gum: New structure/function relationships for this potential beverage flavor stabilizer. *Food Hydrocolloids*. 23:1488–1493.
- Yadav, M. P., Nuñez, A., & Hicks, K. B. 2011. Isolation, purification, and identification of protein associated with corn fiber gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:13289–94.
- Yadav, M. P., Parris, N., Johnston, D. B., & Hicks, K. B. 2008. Fractionation, characterization, and study of the emulsifying properties of corn fiber gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:4181–4187.