



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

**ENTRECRUZAMIENTO COVALENTE DE ARABINOXILANOS
FERULADOS INDUCIDO CON LACASA O PEROXIDASA:
EFECTO EN LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS GELES**

Por:

Nedie Susana Chávez Gutiérrez

TESIS APROBADA POR LA

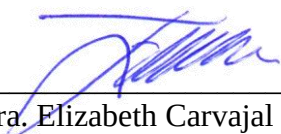
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

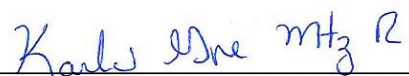
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Nedie Susana Chávez Gutiérrez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Elizabeth Carvajal Millan
Directora de Tesis



Dr. Agustín Rascón Chu
Integrante del comité de tesis



M.C. Karla G. Martínez Robinson
Integrante del comité de tesis



M.C. Rafael Canett Romero
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Entrecruzamiento Covalente de Arabinosilanos Ferulados Inducido con Lacasa o Peroxidasa: Efecto en la Actividad Antioxidante de los Geles” 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 de la autora Nedie Susana Chávez Gutiérrez, 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 de quien ocupe la titularidad de la Dirección 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(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca brindada para continuar con mis estudios dentro del programa de Maestría en Ciencias.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD, A.C.), por abrirme las puertas y permitirme ser parte de su programa de posgrado.

A la Dra. Elizabeth Carvajal Millán, directora de esta tesis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su guía y apoyo. Pero sobre todo, por compartir su experiencia y conocimientos para la realización de este trabajo.

A mi comité de tesis, Dr. Agustín Rascón Chu, M.C. Karla G. Martínez Robinson y M.C. Rafael Canett Romero, por su asesoría, tiempo y disposición para compartirme sus conocimientos.

Al Dr. Jorge Alberto Márquez Escalante y la Dra. María Dolores Figueroa Pizano, por su valiosa aportación y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Q.B. Alma C. Campa Mada, por el apoyo técnico para la realización de este trabajo y por su gran calidad humana y amistad.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biopolímeros y a toda la comunidad CIAD-Hermosillo, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A Dios,

Por otorgarme salud y ayudarme cada día

A mis padres Genaro y Claudia,

Por su apoyo incondicional, por motivarme a continuar con mis estudios y ser ejemplo de vida

A mi Reyna en el cielo,

Por ser el mejor ejemplo de fortaleza y de amor, porque su recuerdo siempre me acompaña

A mis hermanos Dulce, Genarito y Said,

Por acompañarme y estar conmigo en esta etapa

A mi abuelita Gabina,

Por siempre levantarme el ánimo con sus palabras y ocurrencias

A mi Karina,

Por levantarme los ánimos, por ser mi compañera y mi confidente

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE CUADROS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES.....	14
2.1. Los Arabinoxilanos	14
2.2. Estructura Molecular de los Arabinoxilanos	15
2.3. Fuentes de Obtención de los Arabinoxilanos	16
2.4. Métodos de Obtención y Purificación de los Arabinoxilanos	17
2.5. Características Físico-químicas de los Arabinoxilanos.....	18
2.5.1. Peso Molecular	18
2.5.2. Viscosidad Intrínseca.....	18
2.5.3. Solubilidad	19
2.6. Propiedades Funcionales de los Arabinoxilanos.....	19
2.6.1. Actividad Prebiótica	20
2.6.2. Promotores de la Salud	20
2.6.3. Capacidad Gelificante.....	22
2.6.4. Texturizantes	23
2.6.5. Capacidad Antioxidante.....	24
2.7. Actividad Antioxidante del Ácido Ferúlico y sus Dímeros y Trímeros.....	25
2.7.1. Estructura del Ácido Ferúlico.....	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
4.1. Objetivo General.....	28
4.2. Objetivos Específicos.....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1. Fuente de Obtención de los Arabinoxilanos.....	29
5.2. Caracterización de los Arabinoxilanos.....	30
5.2.1. Identidad Molecular	30
5.2.2. Contenido de Azúcares Neutros	30

5.2.3. Contenido de Ácido Ferúlico y sus Dímeros y Trímeros	31
5.2.4 Viscosidad Intrínseca y Masa Viscosimétrica.....	32
5.3. Gelificación de AX	32
5.3.1. Reología de los Geles de AX Formados con Lacasa y Peroxidasa	33
5.4. Actividad Antioxidante de Geles de AX.....	33
5.5. Análisis Estadístico	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES	35
6.1. Extracción y Caracterización de AX.....	35
6.2. Contenido de Ácido Ferúlico, Dímeros y Trímeros de Ácido Ferúlico Antes y Después de la Gelificación	37
6.3. Capacidad Antioxidante en AX Antes y Después del Proceso de Gelificación	39
6.4. Reología de los Geles de AX Formados con Lacasa y Peroxidasa.....	41
6.4.1. Cinética de Gelificación.....	41
6.4.2. Barridos de frecuencia en geles de AX.....	44
7. CONCLUSIONES	47
8. RECOMENDACIONES.....	48
9. REFERENCIAS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura de los arabinoxilanos.	15
2	Posición de arabinosas en arabinoxilanos.....	16
3	Contenido promedio de AX en granos y tejidos enteros.	17
4	Dímeros y trímeros de ácido ferúlico (di-FA y tri-FA) encontrados en geles de arabinoxilanos.....	23
5	Estructura del ácido ferúlico	26
6	Proceso de extracción de AX a partir de DDGS	29
7	Esquema representativo que describe la gelificación de AX por vía enzimática.....	32
8	AX extraídos de DDGS	35
9	Espectro infrarrojo de transformada de Fourier para AX provenientes de DDGS..	37
10	Cinética de gelificación para soluciones de AX al 2% (p/v) inducida con lacasa o peroxidasa.	43
11	Barrido de frecuencia de geles de AX al 2% (p/v) entrecruzados vía lacasa o peroxidasa. Mediciones a 5% de deformación y 25°C.	44
12	Barrido de deformación para soluciones de AX al 2% (p/v) durante la gelificación con lacasa o peroxidasa.....	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Actividad antioxidante de Arabinoxilanos de Pericarpio de Maíz.....	25
2	Características macromoleculares de AX extraídos de DDGS.....	36
3	Contenido de AF, di-AF y tri-AF en AX y geles de AX inducidos con lacasa o peroxidasa.....	39
4	Composición de isómeros de di-FA en geles de AX.....	39
5	Actividad antioxidante de AX y geles inducidos por lacasa y peroxidasa por ABTS+.....	40
6	Actividad antioxidante de AX y geles inducidos por lacasa y peroxidasa por DPPH.....	40
7	Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa al final de la gelificación a 0.25 Hz y 5% de deformación	43
8	Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa. Valores a 0.25 Hz en el barrido de frecuencia.....	45
9	Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa. Valores a 5% en el barrido de deformación.....	46

RESUMEN

Los arabinoxilanos (AX) son polisacáridos formados por una cadena lineal de xilas con sustituciones de arabinosa, las cuales pueden estar esterificadas con ácido ferúlico (AF). Los AX ferulados forman geles covalentes mediante el entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas vía acoplamiento oxidativo del AF con enzimas como lacasa y peroxidasa, formando dímeros (di-AF) y trímeros (tri- AF) de AF. Sin embargo, el efecto de distintas enzimas entrecruzantes en la actividad antioxidante de estos geles no ha sido reportado. El objetivo de esta investigación es estudiar el efecto del tipo de agente entrecruzante (lacasa o peroxidasa) en la actividad antioxidante de geles de AX de un subproducto de la producción de bioetanol de maíz (DDGS). Los AX fueron extraídos con un rendimiento del 3.5% (p/p) y presentaron características similares a las de otros AX de esta fuente (0.5 μg AF/mg AX, A/X de 0.6, $[\eta]$ =114 mL/g, M_v =368 kDa). El espectro FTIR mostró que la identidad molecular del polisacárido extraído corresponde a los AX. Este espectro registró una banda central a 1158 cm^{-1} relacionada con el enlace C-OH, y una banda pequeña a 897 cm^{-1} asignada al enlace glucosídico β (1 $\rightarrow$ 4). Los AX formaron geles al 2 % (p/v) inducidos por lacasa y peroxidasa cuyo módulo elástico (G') y viscoso (G'') fue de 79 y 0.30 y de 94 y 0.41 Pa, respectivamente. Se encontró un 94% de oxidación de AF en los AX después de la gelificación con ambas enzimas. La actividad antioxidante de los geles de AX disminuyó 43% y 22% (método ABTS) y 27 y 21% (método DPPH) al ser formados con lacasa y peroxidasa, respectivamente. Los geles de AX formados con peroxidasa presentaron un mayor contenido de di-AF, en particular de los isómeros 8-5' y 5-5', lo cual podría estar relacionado con la mayor conservación de actividad antioxidante respecto a los geles formados con lacasa.

Palabras clave: arabinoxilanos, lacasa, peroxidasa, ácido ferúlico, geles, actividad antioxidante

ABSTRACT

Arabinoxylans (AX) are polysaccharides formed by a linear chain of xyloses with arabinose substitutions, which can be esterified with ferulic acid (AF). AX form gels by covalent cross-linking involving FA oxidation by oxidative enzymes, such as laccases or peroxidases, forming dimers (di-AF) and trimers (tri- AF) of AF. However, the effect of different cross-linking enzymes on the antioxidant activity of these gels has not been reported. The aim of this research is to study the impact of the type of crosslinking agent (laccase or peroxidase) on the antioxidant activity of DDGS AX gels. AX were extracted with a yield of 3.5% (w/w) and presented characteristics similar to other AX from this source (5 µg AF/mg AX, A/X of 0.6, $[\eta] = 114 \text{ mL/g}$, $M_v = 368 \text{ kDa}$). The FTIR spectrum showed that the molecular identity of the extracted polysaccharide corresponds to the AX with a central band at 1158 cm^{-1} related to the C-OH bond, and a small band at 897 cm^{-1} assigned to the β -(1→4)-glycosidic linkage. The AX formed gels at 2% (w/v) induced by laccase and peroxidase whose elastic (G') and viscous (G'') modulus were 79 and 0.30 and 94 and 0.41 Pa, respectively. A 94% oxidation of FA was found in the AX after gelation with both enzymes. The antioxidant activity of the AX gels decreased 43% and 22% (ABTS method) and 27 and 21 % (DPPH method) when they were formed with laccase and peroxidase, respectively. The AX gels formed with peroxidase presented a higher content of di-AF, in particular 8-5' and 5-5' isomers, which could be related to the greater conservation of antioxidant activity with respect to the gels formed with laccase.

Keywords: arabinoxylans, laccase, peroxidase, ferulic acid, gels, antioxidant activity

1. INTRODUCCIÓN

Los arabinoxilanos (AX) son polisacáridos presentes en diversos cereales, tanto en pericarpio y aleurona como en endospermo. Estos polisacáridos están contenidos en la dieta formando parte de la fibra dietética, siendo además considerados prebióticos (Marquez-Escalante *et al.*, 2018a). Los AX no son digeribles, resisten la hidrólisis en el estómago y la absorción en el intestino delgado humano, pero pueden ser fermentados total o parcialmente por la microbiota del intestino grueso humano (Mendis *et al.*, 2016; Knudsen y Laerke, 2010).

En los últimos años se ha acrecentado el interés por los AX y oligosacáridos de arabinoxilanos (AXOS), ya que se han asociado con efectos benéficos a la salud como antioxidantes (Malunga y Beta, 2015), prebióticos (Marquez-Escalante *et al.*, 2018a), inmunoestimulantes (Mendis *et al.*, 2016), reguladores de glucosa y colesterol (Vogel *et al.*, 2012) y agentes antiproliferativos (Melo-Silveira *et al.*, 2019). Una característica importante de los AX es su capacidad para producir geles por entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas mediante acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico (AF) por vía enzimática. Las enzimas lacasa y peroxidasa favorecen la formación de dímeros (di-FA) y trímeros (tri-FA), los cuales presentan características muy particulares: son neutros, incoloros e inodoros, y poco afectados por cambios de temperatura, fuerza iónica o pH, debido a la presencia de entrecruzamientos covalentes en su red polimérica (Izydorczyk y Biliaderi, 1995).

Las características estructurales de los AX están relacionadas con su fuente y definen las propiedades de los geles formados, por ejemplo, los AX de maíz presentan un mayor contenido de AF que los AX de trigo y por lo tanto forman geles con un contenido más alto de di-AF comparado con geles de AX de trigo. También el tipo de agente entrecruzante utilizado para formar los geles de AX tiene un efecto en las propiedades de éstos. Se ha reportado que los geles formados con peroxidasa contienen mayor proporción del isómero 5-5' y menor módulo elástico que los formados con lacasa (Martínez-López *et al.* 2019). Se ha reportado además que la actividad antioxidante de los AX disminuye al formar el gel porque el acoplamiento oxidativo del AF que origina los di-AF implica una reducción en el contenido de AF en el gel (Méndez-Encinas *et al.*,

2019). Sin embargo, no se conoce aún como puede la variación en el tipo de isómeros de di-AF presentes en el gel de AX modificar la actividad antioxidante de estos geles. Tampoco se conoce el efecto de la presencia de cadenas de AX no entrecruzadas en el gel en la actividad antioxidante de éste. Por lo anteriormente expuesto, el presente trabajo de investigación planteó como pregunta de investigación ¿Qué efecto tiene el tipo de enzima entrecruzante (lacasa o peroxidasa) en la actividad antioxidante del gel de los arabinoxilanos de maíz? Para responder a esta pregunta se estructuró la hipótesis y los objetivos que en las secciones correspondientes del presente manuscrito de tesis se describen y se siguió el procedimiento experimental detallado también en el presente documento.

2. ANTECEDENTES

2.1. Los Arabinoxilanos

Hoffman y Gortner (1927) identificaron por primera vez los arabinoxilanos (AX) y los describieron como una goma viscosa que se encuentra en la harina de trigo. Fueron denominados “pentosanos” porque son polímeros de carbohidratos formados por pentosas (xilosa y arabinosa) (Bastos *et al.*, 2018). Estos polisacáridos se han reportado en los cereales como trigo, centeno, cebada, avena, arroz, sorgo, maíz y mijo (Morales-Ortega *et al.*, 2013) y están presentes como parte de la fibra dietética en el endospermo, el pericarpio y la aleurona de estos cereales (Malunga *et al.*, 2017; J. Marquez-Escalante *et al.*, 2018a).

Los AX tienen gran cantidad de aplicaciones potenciales derivadas de su capacidad gelificante, emulsificante y texturizante, entre otras. Dichas aplicaciones están determinadas por sus características estructurales y fisicoquímicas (Bai *et al.*, 2017; Buksa y Krystijan, 2019; Koegelenberg y Chimphango, 2017). Además, los AX están asociados con distintos beneficios para la salud, como es la actividad antioxidante, prebiótica y reguladora de glucosa postprandial (Lagaert *et al.*, 2010; Mendis *et al.*, 2016; Mendez-Encinas *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019).

También se han empleado geles de AX para la liberación controlada de proteínas modelo y fármacos como la insulina (Martínez-López *et al.*, 2019a; Morales-Burgos *et al.*, 2019), la metilxantina (Iravani *et al.*, 2011), el diclofenaco sódico (Iqbal *et al.*, 2011) y la cafeína (Pérez-Flores *et al.*, 2019), así como probióticos (Morales-Ortega *et al.*, 2014).

2.2. Estructura Molecular de los Arabinoxilanos

La estructura de los AX consiste en una cadena lineal de xilasas con enlaces glicosídicos β -(1 $\rightarrow$ 4),

que contiene residuos de arabinosas unidos con enlaces glucosídicos α -(1 $\rightarrow$ 3) o α -(1 $\rightarrow$ 2), o ambos (**Figura 1**). Las xilosas de la cadena principal pueden estar mono-sustituidas o di-sustituidas, dando como resultado cuatro tipos de patrones de sustitución de xilosas: no sustituido, mono-sustituido en O-2, mono-sustituido en O-3, o di-sustituido en O-2 y 3 (**Figura 2**) (Izydorczyk y Dexter, 2008). Algunos residuos de arabinosa se encuentran esterificados con ácido ferúlico (AF) en la posición O-5. Otros sustituyentes de menor frecuencia son el ácido glucurónico, la galactosa y los grupos acetilo (**Figura 1**) (Mendez-Encinas *et al.*, 2019a).

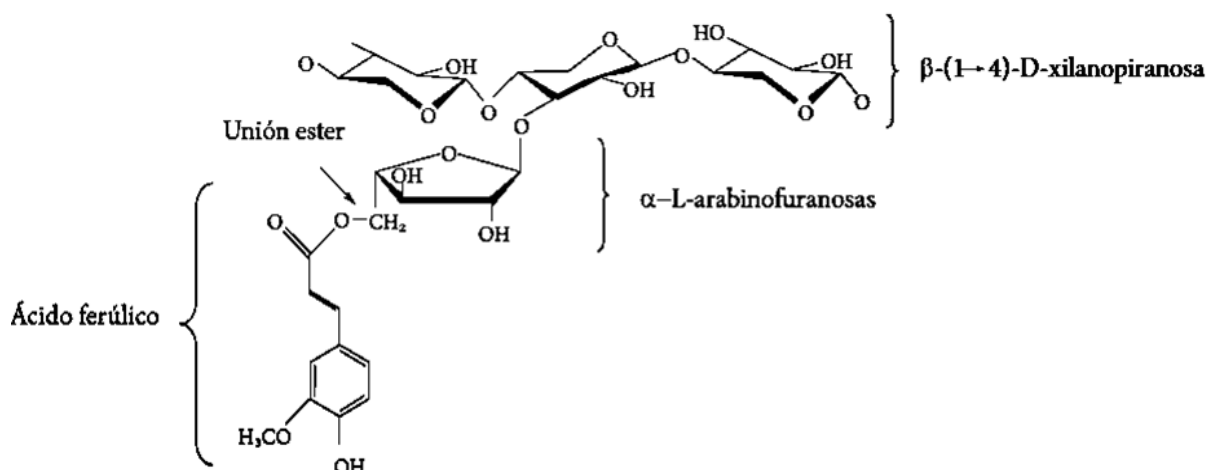


Figura 1. Estructura de los arabinoxilanos.

Fuente: Morales-Ortega *et al.* (2013)

En función de la solubilidad, los AX pueden clasificarse en extraíbles en agua (WEAX) y no extraíbles en agua (WUAX). En los cereales, los WEAX se encuentran principalmente en el endospermo y los WUAX se ubican tanto en la capa aleurona como en el pericarpio. La cantidad de AX en un tejido vegetal puede variar dependiendo del origen, así como de factores ambientales y del estado de madurez. En general, el contenido de WEAX es menor (0.5 a 3.0 %, p/p) en el endospermo de los cereales (trigo, centeno y cebada) que el de WUAX (20 a 30 %, p/p) en el pericarpio de los mismos (Izydorczyk y Biliaderis, 2007).

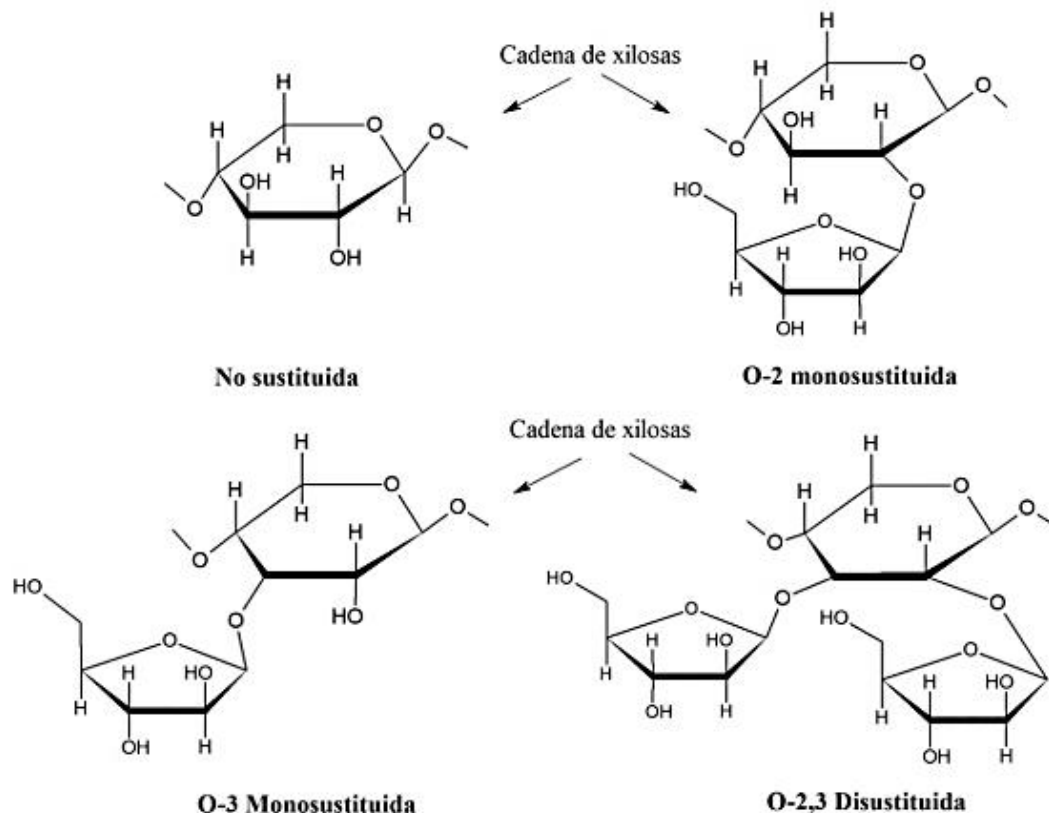


Figura 2. Posición de arabinosas en arabinoxilanos.

Fuente: Mendez-Encinas *et al.* (2019b)

Las características estructurales de los AX están estrechamente relacionadas con sus propiedades físico-químicas. Entre estas características se encuentran el grado de polimerización (GP) y la proporción A/X (proporción de arabinosas unidas a la cadena principal de xilosas), la cual puede variar de 0.3 a 1.1, dependiendo del origen del polisacárido. Otras características son la secuencia de enlaces glicosídicos (patrón de sustitución de arabinosas en la cadena) y la presencia de otros sustituyentes (Mendez-Encinas *et al.*, 2019b).

2.3. Fuentes de Obtención de los Arabinoxilanos

Las principales diferencias entre los AX de los granos de distintos cereales es la distribución y cantidad de sustituciones de arabinosa en el esqueleto de xilano, la secuencia de los diversos

enlaces entre estos dos azúcares (xilosa y arabinosa), el contenido de AF y la presencia de otros sustituyentes (Izydorczyk y Biliaderi, 1995). En general, el contenido de AX en los cereales varía desde 1.2% (p/p) en arroz y hasta 8.5% (p/p) en centeno (**Figura 3**). La mayoría de los AX están presentes en el pericarpio de los granos de cereales, donde representan aproximadamente el 25% del peso seco del grano. En conjunto, se puede concluir que las materias primas y el método de extracción de los AX determinan su peso molecular, proporción A/X, tipo de sustitución de las arabinosas y contenido de AF (Bastos *et al.*, 2018; Mendez-Encinas *et al.*, 2019b).

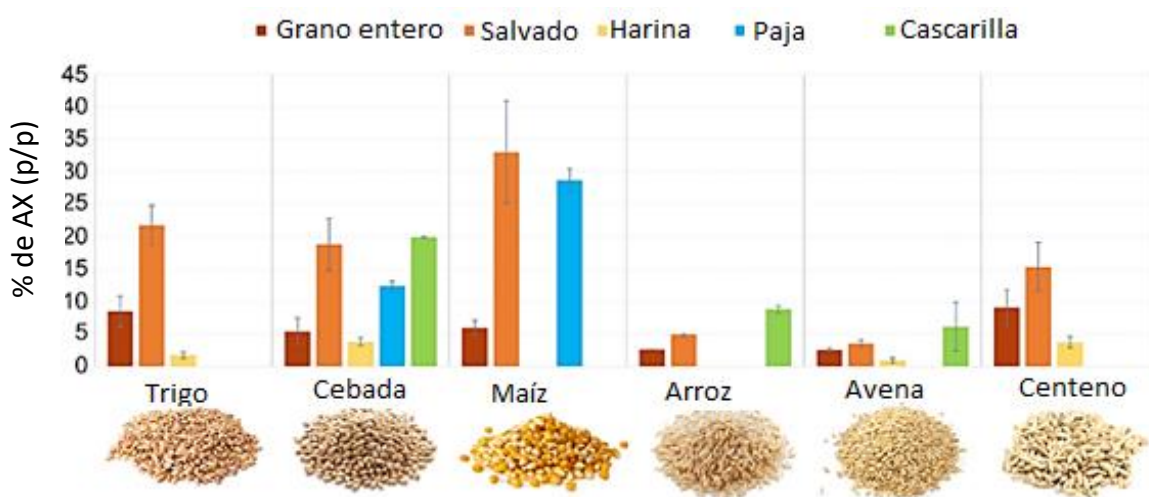


Figura 3. Contenido promedio de AX en granos y tejidos enteros.
Fuente: Bastos *et al.* (2018)

2.4. Métodos de Obtención y Purificación de los Arabinoxilanos

La mayoría de los AX están incluidos en una matriz insoluble en agua en la pared celular de los granos de cereales, solamente los WEAX pueden solubilizarse con agua a presión atmosférica (Izydorczyk y Biliaderi, 1995). La presencia de cantidades variables de proteína, lignina, compuestos fenólicos y otros polisacáridos dificulta la extracción de AX en agua. En consecuencia, se han propuesto metodologías más severas y de múltiples pasos para la extracción de los WUAX, los cuales se pueden extraer mediante tratamientos químicos, enzimáticos o físicos (Bastos *et al.*, 2018; Izydorczyk y Billiaderis, 2007). Además de su solubilidad, las principales diferencias entre

los WEAX y los WUAX son que estos últimos tienen un peso molecular más alto y poseen mayor diversidad en las cadenas laterales, ya que además de arabinosa contienen ácido glucurónico, galactosa y grupos acetilo (Morales-Ortega *et al.*, 2013).

2.5 Características Físico-químicas de los Arabinoxilanos

2.5.1 Peso Molecular

El peso molecular (PM) de los AX depende de su origen y del método utilizado para su obtención. En los WEAX se han reportado valores de PM desde 10 hasta 10 000 kDa, mientras que en WUAX puede exceder los 10 000 kDa. El PM de AX de pericarpio de maíz extraídos con tratamiento alcalino se encuentra entre 244 y 491 kDa. Izydorczyk y Biliaderis, (1995) reportaron PM en intervalos de 134 a 201 kDa en WEAX extraídos de distintas variedades de trigo canadiense. Según Shyama *et al.* (2007), el peso molecular de WEAX de arroz es de 231 kDa, el cual disminuye a 75 kDa después del proceso de malteado.

2.5.2. Viscosidad Intrínseca

La viscosidad intrínseca ($[\eta]$) es un indicador del volumen hidrodinámico ocupado por un polímero aislado en solución. Las características de la molécula de AX como PM y conformación del polímero están relacionados directamente con su viscosidad. Los altos PM y la rigidez de las cadenas hacen que los AX presenten alta $[\eta]$ en dispersiones acuosas (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). La $[\eta]$ varía dependiendo del método de extracción, el tipo y variedad del cereal, así como las condiciones ambientales del cultivo (Saulnier *et al.*, 2013). Para los WEAX de trigo, la $[\eta]$ se encuentra entre 200 y 600 mL/g, con un promedio de 400 mL/g. Carvajal-Millan *et al.* (2007) reportaron una $[\eta]$ de 208 mL/g en WUAX obtenidos de pericarpio de maíz.

2.5.3. Solubilidad

La solubilidad de los AX depende en gran medida del grado de sustitución que presenta la xilosa con unidades de arabinosa, así como su distribución a lo largo de las cadenas, lo cual afecta el potencial de las cadenas de AX para interactuar entre sí o con otros polisacáridos. En general, la presencia de ramificaciones de arabinosa impide la interacción entre regiones lisas de xilasas en las cadenas de AX favoreciendo la solubilidad de este polisacárido en agua (Saulnier *et al.*, 2013). Sternemalm *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la sustitución de arabinosa en la solubilidad de los AX mediante la utilización de soluciones a 1 % de AX y una relación A/X inicial de 0.52. Estos autores observaron que conforme decrecía la relación A/X también disminuía la solubilidad de los AX y atribuyeron este comportamiento a que los residuos de arabinosa favorecen la interacción del polisacárido con el agua. Una vez removidas las sustituciones de arabinosa, las cadenas de xilasas pueden formar interacciones físicas en mayor proporción, en especial puentes de hidrógeno, produciendo agregados insolubles en agua (Morales-Ortega *et al.*, 2013).

2.6. Propiedades Funcionales de los Arabinoxilanos

Las propiedades funcionales de los AX están estrechamente relacionadas con sus características estructurales como el PM, relación A/X y contenido de AF. Los AX presentan un alto potencial de aplicación en la industria de alimentos por su capacidad de retención de agua, emulsificante y texturizante, lo cual ayuda a estabilizar sistemas alimenticios. También son de interés la capacidad gelificante, antioxidante, prebiótica, inmunoestimulante y de regulación de glucosa y colesterol reportadas en AX (Niño-Medina *et al.*, 2010).

2.6.1 Actividad Prebiótica

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de manera benéfica al

huésped y aumentan el número de bifidobacterias y/o lactobacilos que se encuentran en el colon. Los AX son resistentes a la digestión y la absorción en el intestino delgado humano, pero pueden ser fermentados total o parcialmente por la microbiota intestinal en el intestino grueso. Por lo tanto, se cree que los beneficios para la salud de los AX están relacionados con su fermentación. Los efectos benéficos que otorga el consumo de prebióticos incluyen mejoras sobre el metabolismo de los lípidos, el sistema inmunitario y una disminución en el riesgo de cáncer de colon (Mendis *et al.*, 2016; Knudsen y Laerke, 2010; Wang *et al.*, 2020).

Los AX actúan como prebióticos para bacterias como los lactobacilos y las bifidobacterias en el intestino grueso y sus estructuras pueden influir en su potencial prebiótico (Damen *et al.*, 2011). Para hidrolizar los sustratos, las bifidobacterias necesitan la acción conjunta de varias enzimas (Kale *et al.*, 2018). Las cadenas principales de xilosas pueden hidrolizarse por β -xilosidasas o exo-oligoxilanasas reductoras que liberan xilosas, mientras que los residuos de arabinosas pueden ser reducidos por α -L-arabinofuranosidasas producidas por bacterias del colon (Mendis *et al.*, 2016; Pollet *et al.*, 2010).

2.6.2 Promotores de la Salud

Los AX son considerados como promotores de la buena salud debido a sus propiedades funcionales y bioactividad. Se han reportado efectos inmunomoduladores o modificadores de la respuesta biológica, son capaces de interactuar con el sistema inmunitario del huésped y provocan una regulación positiva o negativa de respuestas inmunitarias específicas. La respuesta inmune está mediada por características especializadas asociadas con la mucosa intestinal, que está expuesta a una amplia gama de fibras dietéticas (Mendis *et al.*, 2016). El efecto inmunomodulador de la fibra dietética no solo se atribuye a su fermentación por la microbiota intestinal y la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (Flint *et al.*, 2012), sino que también puede ser el resultado de efectos inmunomoduladores inducidos por esta fibra en el intestino (Bermudez-Brito *et al.*, 2015; Mendis *et al.*, 2016).

Las células NK (natural killer) están cobrando interés como una herramienta para las inmunoterapias contra el cáncer, ya que son un tipo importante de células para el sistema inmunitario. Se sabe que la eliminación de tumores está mediada en parte por la citotoxicidad de las células NK activadas que poseen una actividad antitumoral distinta al liberar citocinas, quimiocinas y otras sustancias tóxicas proinflamatorias para la destrucción de células tumorales (Pang *et al.*, 2018). Diversos estudios han sugerido que los AX de salvado de arroz modificados con bajo peso molecular (30–100 kDa) pueden estimular significativamente el sistema inmunológico al mejorar la actividad de las células NK (Ghoneum y Abedi, 2004; Cholujova *et al.*, 2009). Pérez-Martínez *et al.* (2015) estudiaron el producto comercial MGN-3/Biobran (AX de salvado de arroz) y reportaron que estimula la actividad citotóxica de las células NK contra el neuroblastoma *in vitro* e *in vivo* y aumenta selectivamente la expansión de las células NK. La interleucina 8 (IL-8) es una citocina multifuncional con la capacidad de regular la migración de monocitos, neutrófilos, linfocitos y fibroblastos (Kucharzik *et al.*, 2005). Se ha reportado que los AX pueden aumentar la producción de IL-8, sin embargo, el mecanismo de dicho efecto inmunoestimulador necesita más investigación para establecer la relación entre las características estructurales del polisacárido (Li *et al.*, 2015).

También se ha reportado actividad antiproliferativa en los AX. Melo-Silveira *et al.* (2019) encontraron que los AX disminuyen la proliferación de células de macrófagos murinos (RAW 264.7), de células epiteliales de adenocarcinoma de pulmón humano (A549) y de células de adenocarcinoma cervical humano (HeLa). Estos autores sugieren que los AX pueden ser un antitumoral seguro con efectos antioxidantes y anticoagulantes.

Los AX, al formar parte de la fibra dietética contenida en los cereales y debido a su alta viscosidad, ayudan a reducir la sensación de hambre y aumentan la sensación de saciedad. En humanos se ha registrado un efecto positivo del consumo de AX (Sandberg *et al.*, 2017) o AXOS (Boll *et al.*, 2016) sobre la tolerancia a la glucosa. García *et al.* (2007) encontraron que el consumo de AX durante 6 semanas disminuyó la respuesta de glucosa sérica posprandial, insulina sérica, grelina y triglicéridos en sujetos con sobrepeso e intolerancia a la glucosa. Esto se asoció con disminuciones en las concentraciones plasmáticas totales de grelina, hormona producida y excretada principalmente en el estómago, que afectan inversamente la regulación endocrina del equilibrio energético. Boll *et al.* (2016) estudiaron en adulto sanos los efectos de AXOS sobre la tolerancia a

la glucosa durante la noche. Encontraron que los AXOS tienen el potencial de mejorar la tolerancia a la glucosa en una perspectiva nocturna y los mecanismos sugeridos son una mejor sensibilidad a la insulina y una mayor fermentación intestinal. Además, Sarma *et al.* (2018) observaron en ratones que la inclusión de AX en una dieta alta en grasa promovió la tolerancia a la glucosa, así como la disminución de las altas concentraciones de lipopolisacáridos, de insulina y de leptina en el suero. Altos niveles de estos compuestos son indicativos de una resistencia a la insulina inducida por la endotoxemia metabólica que puede conducir a la diabetes tipo II (Singh *et al.*, 2015).

2.6.3. Capacidad Gelificante

Los AX forman soluciones altamente viscosas, las cuales tienen la capacidad de formar geles mediante la reticulación covalente de los residuos de AF vía oxidación enzimática (peroxidasa/H₂O₂, lacasa/O₂) o química (FeCl₃) (Marquez-Escalante *et al.*, 2018b). La catálisis enzimática de la lacasa está basada en un mecanismo oxidativo en el que el oxígeno es el aceptor final de electrones, catalizando la oxidación del AF (Selinheimo *et al.*, 2007). La peroxidasa cataliza la oxidación del AF en presencia de H₂O₂. La reacción completa utiliza dos moléculas de AF (Selinheimo *et al.*, 2007). Estas enzimas solo inducen la oxidación de AF; la formación de dímeros, trímeros y oligómeros de AF ocurre completamente al azar mediante un mecanismo de radicales libres (Papon *et al.*, 2006). En geles de AX se han identificado cinco dímeros de AF y un trímero de AF, los cuales se muestran en la **Figura 4** (Marquez-Escalante *et al.*, 2018b).

Los geles de AX presentan características muy particulares: son neutros, incoloros e inodoros, y poco afectados por cambios de temperatura, de fuerza iónica o de pH, debido a la presencia de enlaces covalentes (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). La disminución de la relación A/X en la cadena de polímero aumenta la elasticidad de los geles de AX debido a que favorece la agregación del polisacárido.

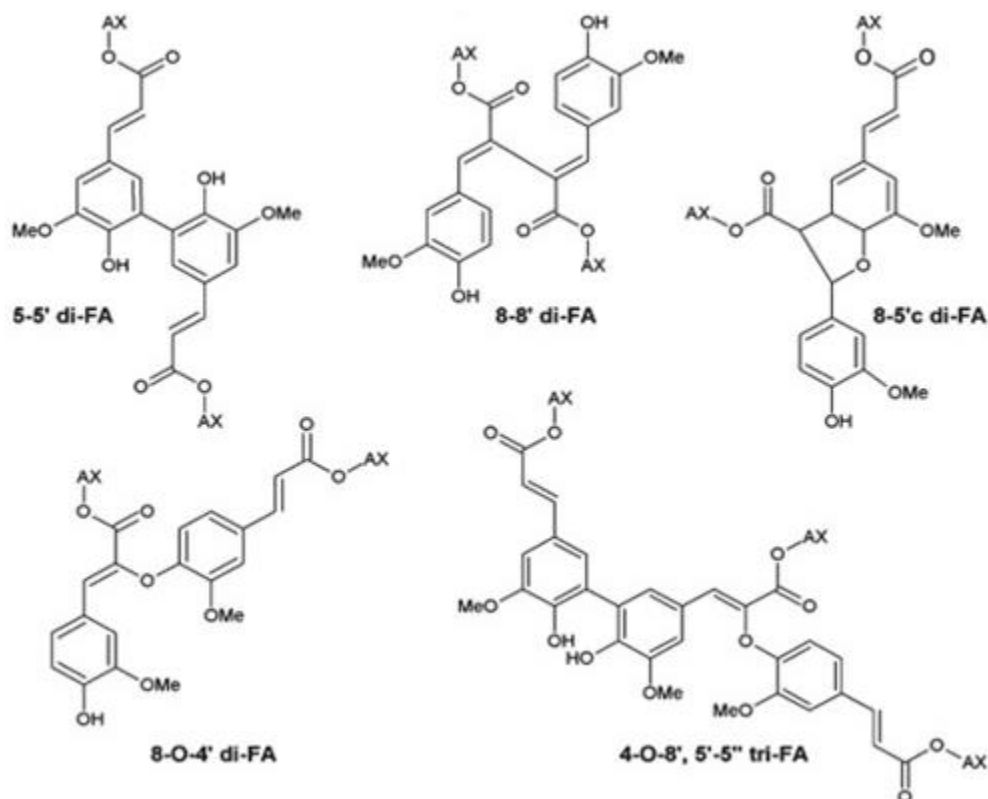


Figura 4. Dímeros y trímeros de ácido ferúlico (di-FA y tri-FA) encontrados en geles de arabinoxilanos.

Fuente: Marquez-Escalante et al. (2018b)

2.6.4. Texturizantes

Los AX han sido estudiados de manera extensiva por el papel que desempeñan en el proceso de panificación y su efecto en el producto final, debido a sus características físicas. Pueden añadirse a los alimentos como modificadores de textura, para mejorar el desarrollo de la masa y los parámetros de calidad del pan (volumen, textura de la miga y envejecimiento) (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). Ayala-Soto *et al.* (2016) encontraron en panes sin gluten, que los AX mejoran la absorción de agua y la reología de la masa y producen panes con un mayor volumen específico, una textura de miga más suave, un menor envejecimiento y calidad general comparable al pan de trigo. Koegelenberg y Chimphango (2017) observaron que 0.8 % (p/p) de AX de salvado de trigo puede reemplazar al 2.5 % (p/p) de la harina de trigo, sin afectar considerablemente los atributos físicos de pan.

2.6.5 Capacidad Antioxidante

Los antioxidantes inhiben el daño oxidativo ya que pueden donar átomos de hidrógeno o electrones para neutralizar los radicales libres que circulan en el cuerpo que están relacionado con el envejecimiento y varias enfermedades crónicas. El consumo de alimentos ricos en antioxidantes puede prevenir la aparición o mitigar el progreso de dichas enfermedades (Malunga y Beta, 2015; Fang *et al.*, 2002) y proporciona protección contra daño oxidativo en el tracto gastrointestinal (Malunga *et al.*, 2017).

El AF presente en los AX puede ser desesterificado mediante las enzimas de la microbiota del colon y absorberse, produciendo efectos antioxidantes en el organismo (Slavin, 2003). Diversos estudios se han enfocado en estudiar esta propiedad de AX y AXOS, y sus efectos sobre el metabolismo. Se ha demostrado que los AXOS poseen propiedades antioxidantes; por ejemplo, el estudio de Malunga y Beta (2015) sobre la capacidad antioxidante de AX y AXOS de aleurona de trigo, mostró que el AF esterificado y su capacidad antioxidante fue más de 1.4 veces mayor en AXOS hidrolizados por *Trichoderma viride* en comparación con los AX que no fueron modificados. En geles de AX ha sido reportado que la actividad antioxidante disminuye respecto a los AX no gelificados (**Cuadro 1**), debido a la formación de di-FA y tri-FA (Paz-Samaniego *et al.*, 2015). La actividad antioxidante en geles de AX se debe al AF restante después del proceso de gelificación del polisacárido. Así, un mayor contenido de AF remanente en geles de AX puede resultar en una mayor actividad antioxidante en ese material (Mendez-Encinas *et al.*, 2018).

Cuadro 1. Actividad antioxidante de arabinosilanos de pericarpio de maíz.

(μmol TEAC/g AX)		
Muestra	ABTS ⁺	DPPH
AX	68.0 ± 0.5	32.2 ± 0.5
Gel de AX	26.0 ± 3.8	12.6 ± 0.4

TEAC= Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (μmol de TEAC/g muestra).

2.7. Actividad Antioxidante del Ácido Ferúlico y sus Dímeros y Trímeros

El ácido 4-hidroxí-3-metoxi-fenil o AF es un ácido hidroxicinámico derivado del ácido cinámico. Se puede encontrar en las paredes celulares de las plantas forrajeras, así como en cereales, verduras y frutas. Puede estar en forma libre o se puede encontrar en forma de esteres ligados a AX y pectinas (Jia *et al.*, 2018).

2.7.1. Estructura del Ácido Ferúlico

Los ácidos hidroxicinámicos se dividen en dos grupos principales: ácidos benzoicos, que contienen siete átomos de carbono (C6-C1) y ácidos cinámicos, que constan de nueve átomos de carbono (C6-C3) (Razzaghi-Asl *et al.*, 2013). El AF se deriva del ácido cinámico y se componen de un grupo CH=CH-COOH (**Figura 5**) (Peña-Torres *et al.*, 2019). El doble enlace carbono (C=C) de la cadena aumenta la resonancia química, que puede ser descrita como una deslocalización de los electrones en los enlaces estabilizando los radicales libres y, por lo tanto, incrementa la capacidad antioxidante de la molécula (Peñarrieta *et al.*, 2014).

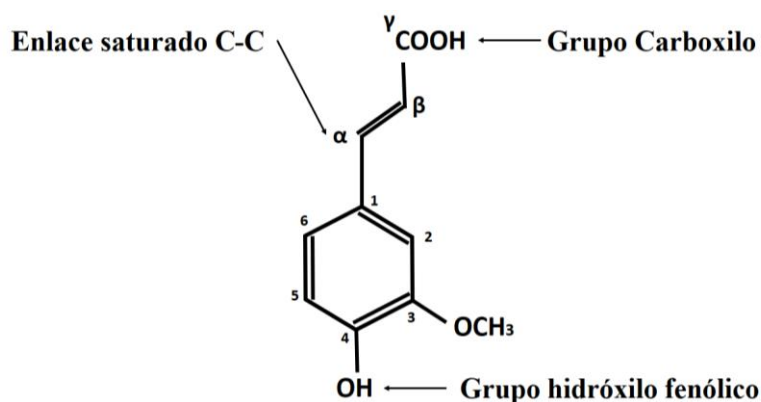


Figura 5. Estructura del ácido ferúlico.

Otras propiedades estructurales importantes incluyen grupos donantes de electrones en el anillo de benceno (3-metoxilo y, lo que es más importante, 4-hidroxilo) que dan la propiedad adicional de terminar reacciones en cadena de radicales libres; el grupo ácido carboxílico con un doble enlace C-C insaturado adyacente que puede proporcionar sitios de ataque adicionales para los radicales libres evitando así que ataquen las membranas; y el grupo de ácido carboxílico que actúa como un grupo de anclaje que lo une a la bicapa lipídica, proporcionando cierta protección contra la peroxidación lipídica (Adelakun *et al.*, 2012). En las plantas, el AF se puede encontrar en forma de dehidrodímeros, trímeros y oligómeros, formados por acoplamiento de radicales libres (Bunzel, 2010).

3. HIPÓTESIS

La actividad antioxidante del gel de los arabinoxilanos ferulados de maíz difiere dependiendo del tipo de enzima (lacasa o peroxidasa) utilizada en el proceso de acoplamiento oxidativo.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar el efecto del tipo de agente entrecruzante (lacasa o peroxidasa) en la actividad antioxidante del gel de los arabinoxilanos ferulados de maíz.

4.2. Objetivos Específicos

1. Extraer arabinoxilanos ferulados a partir de un subproducto de maíz y determinar sus características composicionales y físico-químicas.
2. Determinar las propiedades viscoelásticas y el contenido de entrecruzamientos covalentes del gel de los arabinoxilanos ferulados formado con lacasa o peroxidasa.
3. Evaluar el efecto del tipo de enzima entrecruzante utilizada (lacasa o peroxidasa) sobre la actividad antioxidante del gel de arabinoxilanos ferulados formado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Fuente de Obtención de los Arabinosilanos

Se utilizaron AX extraídos de un subproducto de la producción de bioetanol de maíz, granos secos de destilería con solubles o DDGS, de acuerdo con el método reportado por (Mendez-Encinas *et al.*, 2019a). Los pasos del procedimiento se muestran en la **Figura 6**.

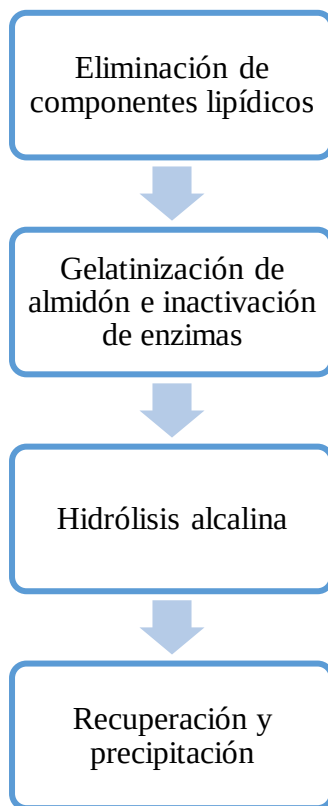


Figura 6. Proceso de extracción de AX a partir de DDGS.

Los AX se extrajeron mediante hidrólisis alcalina. Primeramente, se eliminaron los componentes lipídicos suspendiendo los DDGS (500 g) en etanol absoluto (2500 mL) y agitando en un mezclador rotatorio (100 rpm, 12 h, 25°C). La mezcla DDGS/etanol se filtró utilizando filtros con tamaño de

poro de 2.7 μm (Millipore, EUA) y el filtrado se sometió a un proceso de gelatinización de almidón e inactivación de enzimas, agregando 2500 mL de agua destilada y llevando a ebullición por 30 min. Después de hervir, los DDGS tratados se recuperaron mediante filtración con filtros Millipore con poro de 2.7 μm y se sometieron a una hidrólisis alcalina con NaOH 0.5 N (2500 mL, 25°C, 100 rpm, 2 h en oscuridad). Los sólidos se eliminaron por filtración y el filtrado se centrifugó a 12,096 x g a 20°C por 15 min (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). El sobrenadante se acidificó a pH 4 con HCl 3 N. El líquido acidificado se centrifugó (12 096 x g a 20°C por 15 min) y el sobrenadante se precipitó en etanol al 65% (v/v) durante 12 h a 4°C. El precipitado fue recuperado, congelado a -20°C y liofilizado -40 °C/0.133 mbar (Freezone 6 freeze dryer, Labconco, MO, EUA).

5.2. Caracterización de los Arabinoxilanos

5.2.1. Identidad Molecular

El espectro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de los AX se registró en un espectrómetro (Nicolet iS50 FTIR, Nicolet Instrument Corp., Madison, WI, EUA) utilizando reflectancia total atenuada (ATR), en modo de absorbancia de 400-4000 cm^{-1} y 4 cm^{-1} de resolución, siguiendo el procedimiento reportado por De Anda-Flores *et al.* (2020).

5.2.2. Contenido de Azúcares Neutros

El contenido de azúcares neutros se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), de acuerdo con la metodología establecida por Carvajal-Millan *et al.* (2007). La muestra de polisacárido se sometió a una hidrólisis con ácido trifluoroacético 4 N a 120°C durante 2 h, utilizando manitol como estándar interno. La reacción se detuvo con hielo y los extractos fueron

evaporados a 50°C y enjuagados dos veces con 200 µL de agua Milli-Q. El extracto evaporado fue solubilizado en 1 mL de agua grado CLAR y se filtró empleando filtros con tamaño de poro de 0.45 µm, (Whatman, EUA) para eliminar residuos que pudieran dañar la columna. Se utilizó un HPLC Waters e2695 Separation Module (Milford, EUA) con una columna CH Pb (7.8 x 300 mm) y una elución isocrática, utilizando agua grado HPLC a un flujo de 0.4 mL/min a 70°C.

5.2.3. Contenido de Ácido Ferúlico y sus Dímeros y Trímeros

La cuantificación de ácido ferúlico (AF), dímeros (di-AF) y trímeros (tri-AF) se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR), de acuerdo con Vansteenkiste *et al.* (2004). Los ácidos fenólicos de las muestras se extrajeron mediante saponificación controlada. A 100 mg de muestra (AX o geles de AX) se agregaron 10 mL de NaOH 2N y la mezcla se mantuvo a 100 rpm y 25°C (KS 3000 ic control, IKA, NC, EUA) durante 2 h en atmósfera de nitrógeno y ausencia de luz. Posteriormente, la mezcla se neutralizó con 1 mL de HCl 2N. Después se agregaron 5 mL de éter etílico y se centrifugó a 1000 g, 20°C y 5 min (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). El sobrenadante se recuperó y se protegió de la luz con papel aluminio. La extracción se repitió nuevamente siguiendo el procedimiento anterior. El extracto fue evaporado a 35°C bajo flujo de nitrógeno y el concentrado se resuspendió en 1 mL de mezcla agua-metanol-ácido acético (60:30:10, v/v) y se filtró (Whatman con poro de 0.45 µm). Se utilizó un HPLC Waters e2695 Separation Module (Milford, MA, EUA). Los extractos se inyectaron en una columna C₁₈ (250 mm de longitud x 4.6 mm de diámetro interno). Se utilizó un detector de arreglo de diodos Waters 2998 a una longitud de onda de 320 nm. La elución fue isocrática a un flujo de 0.6 mL/min y 35°C.

5.2.4 Viscosidad Intrínseca y Masa Viscosimétrica

La viscosidad intrínseca $[\eta]$ de los AX fue determinada mediante viscosimetría capilar con

temperatura controlada utilizando un capilar Ubbelohde mediante el método de Mead, Kraemer y Fouss (Carvajal-Millan *et al.*, 2007).

5.3. Gelificación de AX

La elaboración de geles de AX se llevó a cabo por dos métodos diferentes (**Figura 7**), el primero empleando la enzima Lacasa de *Trametes versicolor* (E.C.1.10.3.2, 98 U/mg), y el segundo método utilizando peroxidasa de rábano (E.C.1.11.1.7, 350 U/mg). Primero se preparó una dispersión de AX al 2% (p/v) en una solución reguladora de citrato-fosfato 0.5 M a pH 5. Se utilizó 0.1 U de peroxidasa por mg AX y 1.5 μmol de H_2O_2 por mg AX, mientras que para lacasa se agregó 0.1 U/mg AX (Martínez-López *et al.*, 2019b).

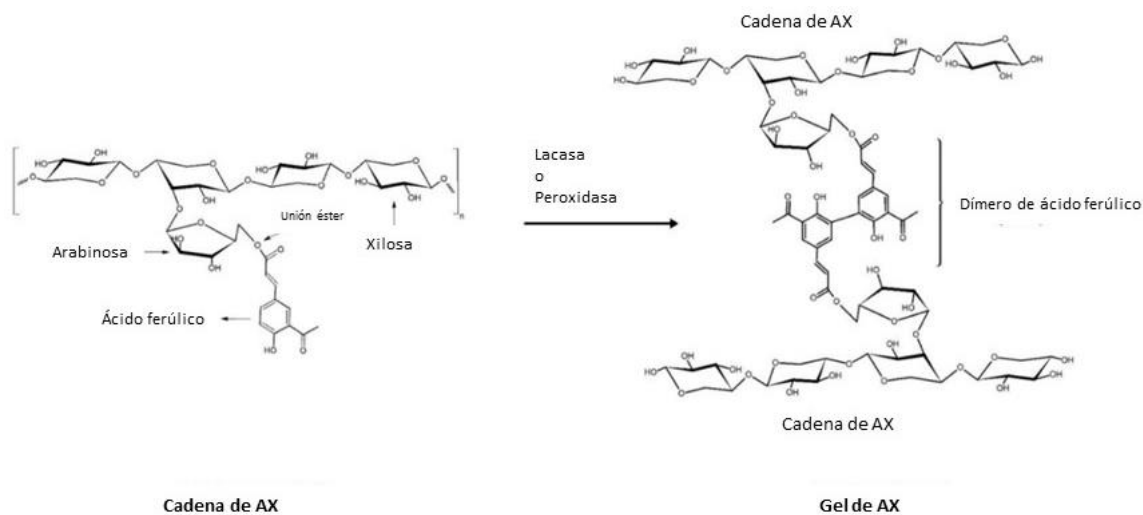


Figura 7. Esquema representativo que describe la gelificación de AX por vía enzimática.
Fuente: Mendez-Encinas *et al.* (2019c)

5.3.1. Reología de los Geles de AX Formados con Lacasa y Peroxidasa

La cinética de formación de los geles de AX al 2% (p/v) fue estudiada mediante reología dinámica

oscilatoria de baja deformación utilizando un reómetro Discovery HR-2, (TA Instruments, EUA), de acuerdo con el procedimiento reportado por Vansteenkiste *et al.* (2004). El módulo elástico (G') y viscoso (G'') se registró durante 1 h a 25°C. Se utilizó una frecuencia de 1 Hz y un porcentaje de deformación del 10%. Una vez formados los geles se les aplicó un barrido de frecuencia de 1 a 10 Hz con 10 % de deformación a 25°C, así como un barrido de deformación de 0.1 a 25% a 1 Hz y 25°C.

5.4 Actividad Antioxidante de Geles de AX

La capacidad antioxidante *in vitro* de los geles formados con lacasa y peroxidasa fue analizada utilizando los métodos ABTS+ y DPPH. El método ABTS+ se utilizó como se describió anteriormente (Rosa *et al.*, 2013; Re *et al.*, 1999). La absorbancia de la muestra y la mezcla de reactivos ABTS+ se midieron a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro a los 7, 15 y 21 min. Los resultados se reportaron como μmol de Trolox por gramo de muestra (μmol TEAC/g). Se utilizó una curva dosis-respuesta de Trolox determinar la capacidad antioxidante de las muestras.

La actividad antioxidante por el método DPPH se midió de acuerdo con el método descrito por Malunga y Beta (2015), con algunas modificaciones. Se utilizaron dispersiones de AX a diferentes concentraciones (0–2000 $\mu\text{g/mL}$). Además, se prepararon soluciones estándar de Trolox (0–15.0 $\mu\text{g/mL}$) en agua ultrapura. Se utilizó una solución de DPPH 45 μM (1.8 mg de DPPH en 30 mL de metanol). Posteriormente, se añadieron 20 mL de agua y se almacenaron en la oscuridad hasta su uso. Se tomaron alícuotas de 400 μL de solución de AX y se mezclaron con 350 μL de metanol absoluto. Luego se añadieron 750 μL de solución DPPH a la mezcla, se agitaron en vórtex y se mantuvieron en la oscuridad. Las mediciones se realizaron a los 40 y 60 min a una absorbancia de 515 nm usando un espectrofotómetro. La actividad antioxidante se calculó mediante una curva dosis-respuesta de Trolox y los resultados se expresaron como μmol de TEAC/g de muestra.

5.5 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como medias ($\pm$) desviación estándar de tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y una comparación por Tukey-Kramer (Software NCSS versión 2021) entre los AX y los geles de AX formados con lacasa o peroxidasa.

6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1. Extracción y Caracterización de AX

El rendimiento de extracción de AX a partir de DDGS fue de 3.5% (peso de AX/ peso de DDGS), siguiendo la metodología de Carvajal-Millan *et al.* (2007). El polisacárido se obtuvo en forma de un polvo fino como se muestra en la **Figura 8**. El porcentaje de extracción con 2 h de hidrólisis alcalina fue mayor que lo reportado en investigaciones previas con tiempos de 15, 30 y 60 min (De Anda-Flores *et al.*, 2020; Márquez-Escalante *et al.*, 2019; Méndez-Encinas *et al.*, 2018).



Figura 8. AX extraídos de DDGS.

Las características macromoleculares de los AX obtenidos se presentan en el **Cuadro 2**. Los AX presentaron una proporción arabinosa/xilosa (A/X) de 0.60 ± 0.03 , lo que indica que la estructura del polisacárido se encuentra moderadamente ramificada con arabinosas. El contenido de AF fue de 0.5 ± 0.04 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ AX), menor al reportado en investigaciones previas con tiempos más cortos de hidrólisis alcalina (De Anda-Flores *et al.*, 2020; Márquez-Escalante *et al.*, 2019; Méndez-Encinas *et al.*, 2018). No fueron detectados dímeros y trímeros de AF (di-AF y tri-AF) en la

estructura del polisacárido a diferencia de investigaciones pasadas, donde se ha reportado la presencia de los di-AF 5-5', 8-5' y 8-O-4'. Estas diferencias se pueden atribuir al tiempo más prolongado de hidrólisis alcalina (2 h) del presente estudio, en comparación con tiempos más cortos (15, 30 y 60 min) utilizados en investigaciones previas, ya que los enlaces éster son muy susceptibles a la saponificación. Los valores de viscosidad intrínseca $[\eta]$ y peso molecular viscosimétrico (Mv) estuvieron dentro del rango reportado para otros AX (Niño-Medina et al., 2010).

Cuadro 2. Características macromoleculares de AX extraídos de DDGS.

Componente	Valor
Proporción A/X	0.60 ± 0.03
Ácido ferúlico ($\mu\text{g}/\text{mg}$ AX)	0.50 ± 0.04
di-AF	nd
tri-AF	nd
Viscosidad intrínseca $[\eta]$ (mL/g)	114 ± 13
Peso molecular viscosimétrico (Mv) kDa	368 ± 35

nd: no detectado. Valores medios de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar.

Los AX presentaron un espectro FTIR característico para este polisacárido en maíz, similar al reportado anteriormente por otros autores (**Figura 9**). Los AX presentaron una región característica para este polisacárido entre 1200 y 900 cm^{-1} . La banda de absorción máxima en 1035 cm^{-1} corresponde a la flexión de C–OH de los enlaces glicosídicos β -(1 $\rightarrow$ 4) entre las unidades de xilosas que forman la columna vertebral los AX. También se encontraron bandas en 3413 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos OH y en 2854 cm^{-1} correspondiente a los grupos CH_2 . La banda a 1720 cm^{-1} está relacionada con los enlaces éster que podrían asignarse a los ácidos fenólicos. Los resultados del espectro FTIR coinciden con los reportados por Mendez-Encinas *et al.* (2019a).

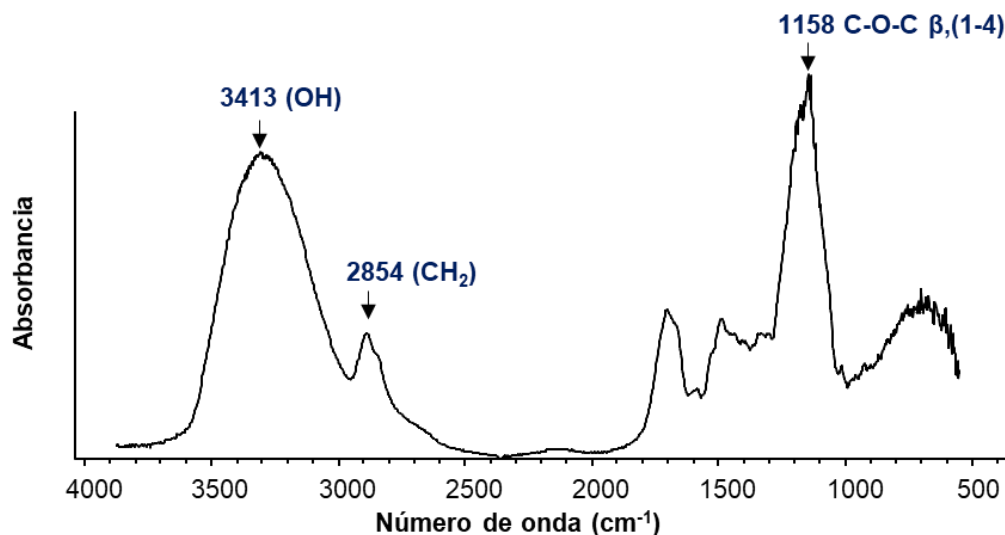


Figura 9. Espectro infrarrojo de transformada de Fourier para AX provenientes de DDGS.

6.2. Contenido de Ácido Ferúlico, Dímeros y Trímeros de Ácido Ferúlico Antes y Después de la Gelificación

Los AX extraídos de DDGS presentaron un contenido de AF de 0.5 µg/mg de AX y no se encontró la presencia de dímeros y trímeros de AF (di-AF y tri-AF). Después del proceso de gelificación de los AX, el AF se oxidó en un 94% al utilizar la enzima lacasa o peroxidasa como agente entrecruzante. No se presentaron diferencias significativas, respecto al contenido de tri-AF en los geles, sin embargo, aquellos inducidos con peroxidasa presentaron un mayor contenido de di-AF respecto a los geles formados con lacasa (**Cuadro 3**). En los geles formados con lacasa o peroxidasa, el isómero 8-5' fue el di-AF mayoritario. No se encontraron diferencias significativas en el contenido del di-AF 8-O-4' mientras que el contenido de los di-AF 8-5' y 5-5' fue más alto en geles formados con peroxidasa (**Cuadro 4**). Una mayor formación del di-AF 5-5' en geles de AX de maíz formados con peroxidasa respecto a lo inducidos con lacasa fue anteriormente reportado por Martínez-López et al. (2018).

Los porcentajes de los isómeros de di-AF e los geles de AX confirman que el entrecruzamiento ya sea con lacasa o peroxidasa resulta en el isómero 8-5' como di-AF mayoritario (61 y 59%, respectivamente) mientras que los di-AF 8-O-4' y 5-5' representaron el 20 y 19% en geles

formados con lacasa y el 25% y 16% en los obtenidos vía peroxidasa, respectivamente. Es interesante como en proporción porcentual, el dímero 5-5' representa un valor mayor en geles obtenidos con lacasa (19%) que con peroxidasa (16%). En un estudio previo realizado por Martínez-López (2011), se encontró que el uso de lacasa como entrecruzante de AX generaba geles con un contenido similar de di-AF pero una mayor proporción del isómero 5-5' en los inducidos con peroxidasa. Las diferencias en los resultados encontrados en el presente estudio podrían estar relacionado con las condiciones de gelificación y las características de los AX utilizados. Martínez-López (2011) utilizó AX con un contenido de AF de 0.25 µg/mg AX, una proporción A/X de 0.72, una viscosidad intrínseca $[\eta]$ de 265 mL/g y un peso molecular de 197 kDa mientras que en el presente estudio los valores para esas variables fueron de 0.5 µg/mg AX, A/X=0.6, $[\eta]$ =114 mL/g y 368 kDa, respectivamente. Es posible que estas diferencias hayan favorecido la mayor formación de di-FA totales en los geles de AX inducidos con peroxidasa en el presente estudio. Un menor grado de ramificación de arabinosas (A/X=0.60 < A/X=0.72) disminuye la solubilidad de los AX en agua, lo cual pudo dificultar el acceso de la lacasa a los AF de las cadenas de polisacárido, mientras que la catálisis vía peroxidasa inicia con la participación del H₂O₂, la cual es una molécula mucho más pequeña que puede acceder más fácilmente a los AF para iniciar el entrecruzamiento de los AX. Por otra parte, en el presente estudio la gelificación se llevó a cabo a una concentración del 2% (p/v) de AX mientras que Martínez-López (2011) la realizó a 4% (p/v). Es posible que una menor concentración de AX en el medio de reacción –y, por tanto, una menor viscosidad del mismo–, haya favorecido la difusión del H₂O₂ durante la gelificación vía peroxidasa, resultando en una mayor cantidad de dímeros formados en relación a los obtenidos con lacasa.

Cuadro 3. Contenido de AF, di-AF y tri-AF en AX y geles de AX inducidos con lacasa o peroxidasa.

Muestra	AF (µg/mg AX)	di-FA (µg/mg AX)	tri-FA (µg/mg AX)
AX polvo	0.50 ± 0.04 ^a	nd	nd
Gel AX (lacasa)	0.030 ± 0.003 ^b	0.015 ± 0.001 ^b	0.002 ± 0.001 ^a
Gel AX (peroxidasa)	0.031 ± 0.001 ^b	0.020 ± 0.001 ^a	0.002 ± 0.001 ^a

nd: no detectado. Valores medios de tres repeticiones ± desviación estándar.

Letras distintas en una misma columna indican que la diferencia entre estas medias es estadísticamente significativa.

Cuadro 4. Composición de isómeros de di-FA en geles de AX.

Muestra	8-5' (µg/mg AX)	8-O-4' (µg/mg AX)	5-5' (µg/mg AX)
Gel AX (lacasa)	0.009 ± 0.001 ^b	0.003 ± 0.001 ^a	0.003 ± 0.001 ^b
Gel AX (peroxidasa)	0.012 ± 0.001 ^a	0.003 ± 0.001 ^a	0.005 ± 0.001 ^a

Valores medios de tres repeticiones ± desviación estándar.

Letras distintas en una misma columna indican que la diferencia entre estas medias es estadísticamente significativa.

6.3. Capacidad Antioxidante en AX Antes y Después del Proceso de Gelificación

La actividad antioxidante de los AX y los geles de AX inducidos con lacasa o peroxidasa determinada por el método ABTS+ y el método DPPH se presentan en los **Cuadro 5** y **6**.

Cuadro 5. Actividad antioxidante de AX y geles inducidos por lacasa y peroxidasa por ABTS+.

Muestra	ABTS+ µmol TEAC/g muestra
AX polvo	17.0 ± 0.4 ^a
Gel AX lacasa	9.6 ± 0.1 ^b
Gel AX peroxidasa	13.2 ± 0.3 ^b

TEAC= Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (µmol de TEAC/g muestra).

Valores medios de tres repeticiones ± desviación estándar.

Letras distintas en la columna indican que la diferencia entre estas medias es estadísticamente significativa.

Cuadro 6. Actividad antioxidante de AX y geles inducidos por lacasa y peroxidasa por DPPH.

Muestra	DPPH µmol TEAC/g muestra
AX Polvo	4.2 ± 0.1 ^c
Gel Lacasa	3.0 ± 0.1 ^b
Gel Peroxidasa	3.3 ± 0.1 ^a

TEAC= Capacidad antioxidante equivalente a Trolox (µmol de TEAC/g muestra).

Valores medios de tres repeticiones ± desviación estándar.

Letras distintas en la columna indican que la diferencia entre estas medias es estadísticamente significativa.

Tanto al utilizar el método ABTS+ como el método DPPH los AX y los AX gelificados presentaron actividad antioxidante. En general, los valores registrados por el método ABTS son más altos que los obtenidos con el método DPPH. Este efecto ya ha sido anteriormente reportado y se ha relacionado con una mayor afinidad del radical fenoxilo hacia el radical ABTS en relación con el radical DPPH (Márquez-Escalante et al., 2020).

La actividad antioxidante disminuyó después del proceso de gelificación debido a la oxidación del AF inicialmente presente en el polisacárido. Esta pérdida fue de 43 y 22% por el método ABTS al utilizar lacasa y peroxidasa, respectivamente. Al aplicar el método DPPH la reducción fue de 27 y 21% para geles formados con lacasa y peroxidasa, respectivamente. La disminución de la actividad antioxidante en geles de AX respecto a los AX no gelificados ha sido previamente reportada en un rango entre 40 y 70% utilizando lacasa como entrecruzante; sin embargo, no existen reportes previos a los del presente estudio con peroxidasa como agente entrecruzante de AX (Mendez-Encinas *et al.*, 2019c; Marquez-Escalante *et al.*, 2020).

Los geles de AX inducidos con peroxidasa como entrecruzante presentaron una actividad antioxidante mayor que los formados con lacasa. Este resultado podría estar relacionado con el mayor contenido de di-AF en los geles formados con peroxidasa, en particular de las estructuras isómericas 8-5' y 5-5', lo cual concuerda con el reporte de Jia *et al.* (2018), quien encontró que los di-AF 8-5' y 5-5' presentan mayor actividad antioxidante. Estos autores reportaron que el sitio de unión entre los monómeros de AF determina la estabilidad del di-AF formado y por tanto su actividad antioxidante. Por otra parte, el di-AF 5-5' podría favorecer la actividad antioxidante en los geles inducidos con peroxidasa porque es el único isómero de di-AF identificado en la formación de uniones intra cadena de AX (Hatfield y Ralph, 1999; Martínez-López et al., 2019b) lo cual generaría en teoría más cadenas libres en la red polimérica las cuales al tener mayor movilidad favorecerían la interacción con los radicales ABTS y DPPH en el medio de reacción.

6.4. Reología de los Geles de AX Formados con Lacasa y Peroxidasa

6.4.1 Cinética de Gelificación

La **Figura 10** muestra la evolución del módulo de elasticidad (G') y el módulo de viscosidad (G'') de las soluciones de AX al 2 % (p/v) tratadas con lacasa o peroxidasa en función del tiempo. Para ambos sistemas de gelificación se obtuvo un comportamiento similar con un incremento de G' en función del tiempo hasta alcanzar un *pseudo plateau*. Al final de la cinética, los geles presentaron valores de G' y G'' de 79 y 0.3 Pa para lacasa, respectivamente mientras que para peroxidasa esos valores fueron de 94 y 0.4 Pa, respectivamente. Estos valores están dentro del rango reportado para otros geles de AX extraídos de DDGS (Méndez-Encinas et al., 2019; Márquez-Escalante et al., 2020).

Las diferencias en la reticulación de los AX podrían explicarse por los mecanismos de reacción enzimática. La lacasa cataliza la oxidación de AF esterificado en el AX por la interacción entre el O_2 y el grupo de cobre en la enzima, lo que resulta en una reacción retardada. En la catálisis de peroxidasa, el H_2O_2 actúa en la primera etapa de la reacción y, dado su menor peso molecular, puede acceder más fácilmente al AF de los AX, favoreciendo así el acoplamiento oxidativo de las cadenas. Esto podría explicar el mayor contenido de di-AF en geles obtenidos con peroxidasa respecto al generado con lacasa como se reporta en el **Cuadro 4**. La estructura de di-AF 5-5' es el único isómero que se ha relacionado con la formación de uniones tanto inter como intra cadena en AX, los otros isómeros, el 8-5' y el 8-O-4' forman solamente uniones inter cadena (Hatfield y Ralph, 1999; Martínez-López et al., 2019b). Así, las posibles uniones di-AF 5-5' que no unen cadenas distintas de AX, es decir que forman uniones intra cadena, pueden aportar actividad antioxidante al gel pero no elasticidad a la red polimérica del mismo. Las características viscoelásticas de los geles estudiados se resumen en el **Cuadro 7**. Los valores bajos de la tangente delta confirman que los materiales son predominantemente elásticos.

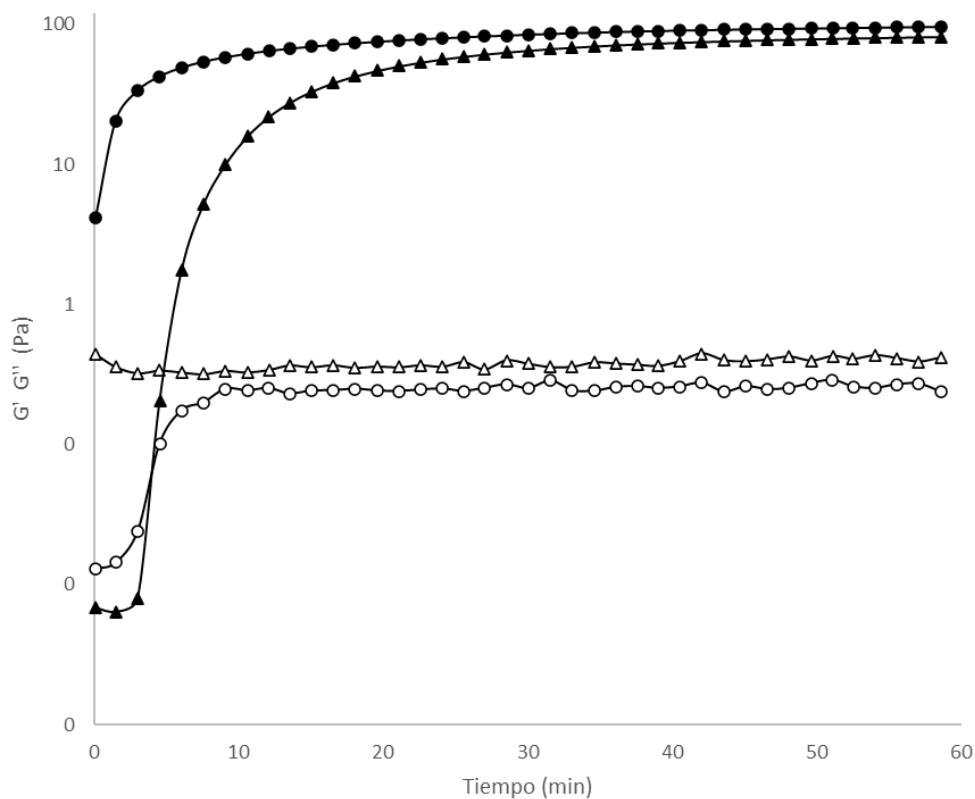


Figura 10. Cinética de gelificación para soluciones de AX al 2% (p/v) inducida con lacasa o peroxidasa. Mediciones a 0.25 Hz, 5% de deformación y 25°C. Lacasa (G' ▲, G'' △); peroxidasa (G' ●, G'' ○). Promedio de tres repeticiones.

Cuadro 7. Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa al final de la gelificación a 0.25 Hz y 5% de deformación.

	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tangente delta (G''/G')
Lacasa	79 ± 7^b	0.30 ± 0.03^b	0.003 ± 0.001^a
Peroxidasa	94 ± 5^a	0.41 ± 0.13^a	0.004 ± 0.002^a

Valores medios de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar.

Letras distintas en la columna indican que la diferencia entre estas medias es estadísticamente significativa.

6.4.2 Barridos de Frecuencia en Geles de AX

Los espectros mecánicos y barridos de deformación de los geles formados por lacasa o el sistema

POD/H₂O₂ después de una hora a 25°C se muestran en las **Figuras 11 y 12** y permiten conocer la estabilidad de los geles al ser sometidos a variaciones de frecuencia y de deformación, respectivamente. En estos gráficos se observa un comportamiento típico de un gel con valores de G' lineales e independientes de la frecuencia de deformación y valores de G'' menores y dependientes de la frecuencia. Este comportamiento es similar a lo reportado anteriormente para geles de AX inducidos por lacasa o el sistema POD/H₂O₂ (Martínez-López *et al.*, 2019b). Los valores de tangente delta (G'/G'') son menor a 1, indicando la presencia de un sistema elástico covalente para ambas enzimas (Ross-Murphy, 1984). En los **Cuadros 8 y 9** se presentan las características viscoelásticas de los geles a 0.25 Hz y a 5% de deformación, respectivamente; las cuales son las condiciones de frecuencia y deformación son las utilizadas en la cinética de gelificación (**Figura 10**).

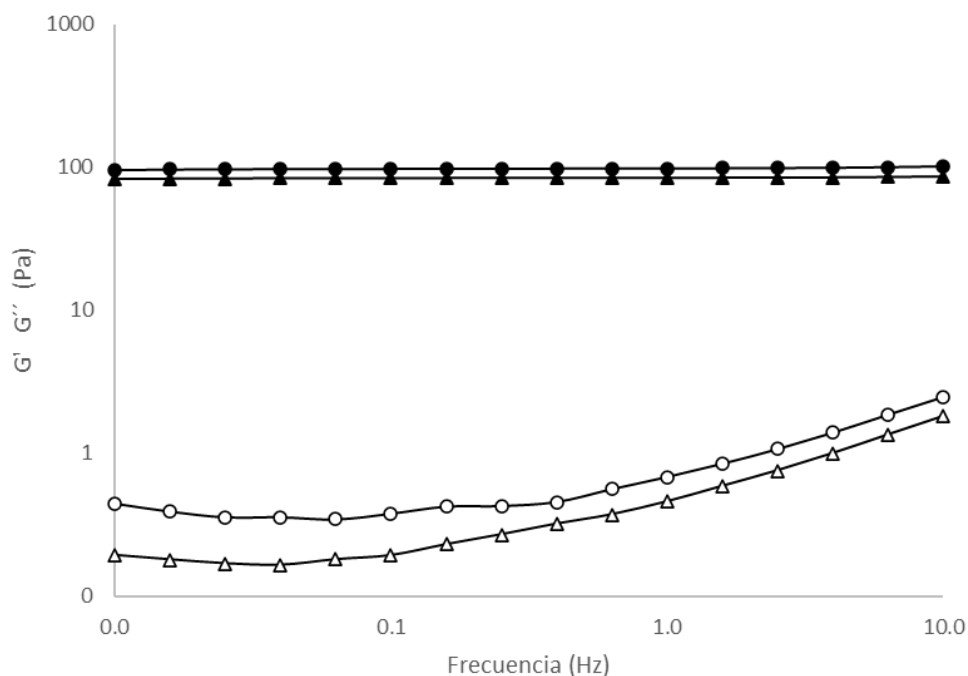


Figura 11. Barrido de frecuencia de geles de AX al 2% (p/v) entrecruzados vía lacasa o peroxidasa. Mediciones a 5% de deformación y 25°C. Lacasa (G' ▲, G'' △); peroxidasa (G' ●, G'' ○). Promedio de tres repeticiones.

Cuadro 8. Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa. Valores a 0.25 Hz en el barrido de frecuencia.

	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tangente delta G''/G'
Lacasa	85 ± 6^b	0.32 ± 0.05^b	0.003 ± 0.001
Peroxidasa	98 ± 6^a	0.45 ± 0.08^a	0.004 ± 0.001

Valores medios de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar.
 Letras distintas en la columna indican que la diferencia entre estas medias es estadísticamente significativa.

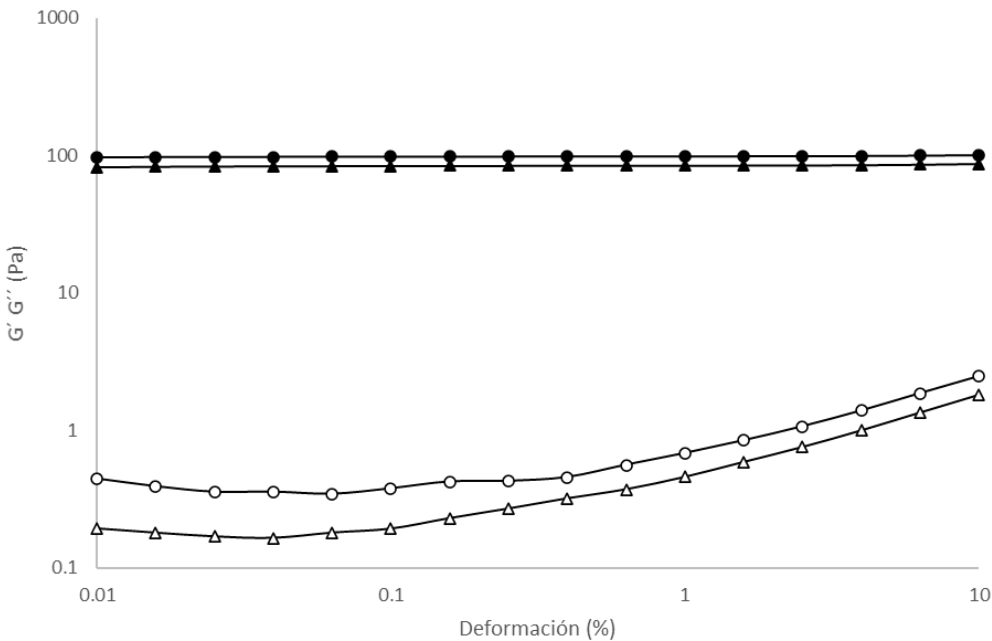


Figura 12. Barrido de deformación para soluciones de AX al 2% (p/v) durante la gelificación con lacasa o peroxidasa. Mediciones a 0.25 Hz y 25°C. Lacasa (G' ▲, G'' △); peroxidasa (G' ●, G'' ○). Promedio de tres repeticiones.

Cuadro 9. Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa. Valores a 5% en el barrido de deformación.

	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tangente delta G''/G'
Lacasa	85 ± 6^b	1.4 ± 0.1^b	0.015 ± 0.001
Peroxidasa	99 ± 6^a	1.9 ± 0.1^a	0.019 ± 0.001

Valores medios de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar.
 Letras distintas en la columna indican que la diferencia entre estas medias es estadísticamente significativa.

7. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de estudio utilizadas, la obtención de AX provenientes de DDGS generó un rendimiento de 3.5% (p/p). Los AX así extraídos presentaron identidad molecular (espectro FTIR) y características composicionales y macromoleculares similares a las previamente reportadas para este polisacárido en otros estudios (0.5 μg AF/mg AX, A/X de 0.6, $[\eta]=114$ mL/g, $M_v=368$ kDa). No se encontraron di-AF en los AX obtenidos, estos se formaron después del proceso de gelificación. Los AX formaron geles al 2 % (p/v) inducidos por lacasa y peroxidasa. El módulo elástico (G') y viscoso (G'') fue mayor en los geles obtenidos vía peroxidasa. Se encontró un 94% de oxidación de AF en los AX después de la gelificación con ambas enzimas. Los geles de AX formados con peroxidasa presentaron un mayor contenido de di-AF, en particular de los isómeros 8-5' y 5-5'. La actividad antioxidante de los geles de AX disminuyó 43% y 22% (método ABTS) y 27 y 21% (método DPPH) al ser formados con lacasa y peroxidasa, respectivamente, lo cual se atribuye a la pérdida de AF durante el acoplamiento oxidativo. La menor reducción de actividad antioxidante en los geles formados con peroxidasa podría estar relacionado con el mayor contenido de di-AF, respecto a los formados con lacasa, en particular de los isómeros 8-5' y 5-5'. Los resultados indican que la actividad antioxidante de los geles de AX de maíz difiere dependiendo del tipo de enzima (lacasa o peroxidasa) utilizada en el proceso de acoplamiento oxidativo, siendo mayor en los geles inducidos vía peroxidasa.

8. RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones sobre la actividad antioxidante de geles de AX inducidos con lacasa o peroxidasa, sería interesante considerar estudiar la población y tipo de radicales libres formados durante la catálisis. Para ello podría utilizarse resonancia paramagnética electrónica. Esto generaría nuevo conocimiento sobre el mecanismo del acoplamiento oxidativo de los AX al ser inducidos con distinto agente entrecruzante.

Otro aspecto que sería importante explorar es el efecto de las características macromoleculares de los AX (A/X, $[\eta]$, PM, contenido y distribución de AF, contenido y composición de la fracción proteica) y la concentración del polisacárido sobre las propiedades reológicas y antioxidantes de los geles formados vía lacasa y vía peroxidasa.

Finalmente, se sugiere también integrar análisis de morfológicos detallados de los geles de AX formados con ambas enzimas tales como microscopía electrónica de barrido o microscopía de fuerza atómica. Estos análisis morfológicos aportarían información complementaria sobre la forma y tamaño de las cavidades formadas en los geles así como la topografía de los mismos, lo cual sería de gran utilidad para considerar posibles aplicaciones potenciales.

9. REFERENCIAS

- Adelakun, O.E., Kudanga, T., Parker, A., Green, I.R., Le Roes-Hill, M. y Burton, S.G. 2012. Laccase-catalyzed dimerization of ferulic acid amplifies antioxidant activity. *Journal of Molecular Catalysis* 74(1–2):29–35.
- Ayala-Soto, F.E., Campanella, O.H., Serna-Saldívar, S.O. y Welte-Chanes, J. 2016. Changes in the structure and gelling properties of maize fiber arabinoxylans after their pilot scale extraction and spray-drying. *Journal of Cereal Science* 70:275–281.
- Bai, L., Huan, S., Li, Z., y McClements, D.J. 2017. Comparison of emulsifying properties of food-grade polysaccharides in oil-in-water emulsions: Gum arabic, beet pectin, and corn fiber gum. *Food Hydrocolloids* 66(1):144–153.
- Bastos, R., Coelho, E., y Coimbra, M.A. 2018. Arabinoxylans from cereal by-products: Insights into structural features, recovery, and applications. En: Galanakis (ed.). *Sustainable Recovery and Reutilization of Cereal Processing By-Products*. Elsevier, Cambridge, 227-251 pp.
- Bermudez-Brito, M., Sahasrabudhe, N.M., Rösch, C., Schols, H.A., Faas, M.M. y de Vos P. 2015. The impact of dietary fibers on dendritic cell responses in vitro is dependent on the differential effects of the fibers on intestinal epithelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 59(4):698-710.
- Boll, E.V.J., Ekström, L.M., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Nilsson, A.C., Björck, I.M. y Östman, E.M. 2016. Effects of wheat bran extract rich in arabinoxylan oligosaccharides and resistant starch on overnight glucose tolerance and markers of gut fermentation in healthy young adults. *European Journal of Nutrition* 55(4):1661-1670.
- Buksa, K. y Krystyjan, M. 2019. Arabinoxylan–starch–protein interactions in specially modified rye dough during a simulated baking process. *Food Chemistry* 287:176–185.
- Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J.A., Micard, V., León, N.P. y Gardea, A. 2007. Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers* 69(2):280–285.
- Chen, Z., Li, S., Fu, Y., Li, C., Chen, D. y Chen, H. 2019. Arabinoxylan structural characteristics, interaction with gut microbiota and potential health functions. *Journal of Functional Foods* 54:536–551.
- Cholujova, D., Jakubikova, J. y Sedlak J. 2009. BioBran-augmented maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Neoplasma* 56(2):89-95.
- Damen, B., Verspreet, J., Pollet, A., Broekaert, W.F., Delcour, J.A. y Courtin, C.M. 2011. Prebiotic effects and intestinal fermentation of cereal arabinoxylans and arabinoxylan oligosaccharides in rats depend strongly on their structural properties and joint presence. *Molecular Nutrition & Food Research* 55(12):1862-1874.
- De Anda-Flores, Y., Carvajal-Millan, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascon-Chu, A., Martínez-López, A.L., Marquez-Escalante, J., Brown-Bojorquez, F. y Tanori-Cordova, J. 2020. Covalently

cross-linked nanoparticles based on ferulated arabinoxylans recovered from a distiller's dried grains byproduct. *Processes* 8, 691, <https://doi.org/10.3390/pr8060691>.

- Fang, Y.Z., Yang, S. y Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18(10):872–879.
- Flint, H.J., Scott, K.P., Louis, P. y Duncan, S. H. 2012. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 9(10):577–589.
- Ghoneum, M. y Abedi, S. 2004. Enhancement of natural killer cell activity of aged mice by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *Journal of Pharmacy & Pharmacology* 56(12):1581–1588.
- Hatfield, R.D. y Ralph, J. 1999. Modelling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls. *J. Sci. Food Agric.* 79: 425–427.
- Hoffman, W. F. y Gortner, R.A. 1927. The preparation and analysis of the various proteins of wheat flour with special reference to the globulin, albumin and proteose fractions. *Cereal Chemistry* 4: 221–229.
- Iqbal, M.S., Akbar, J., Hussain, M.A., Saghir, S. y Sher, M. 2011. Evaluation of hot-water extracted arabinoxylans from ispaghula seeds as drug carriers. *Carbohydrate Polymers* 83(3):1218–1225.
- Iravani, S., Fitchett, C.S. y Georget, D.M.R. 2011. Physical characterization of arabinoxylan powder and its hydrogel containing a methyl xanthine. *Carbohydrate Polymers* 85(1):201–207.
- Izydorczyk, M.S. y Dexter, J.E. 2008. Barley b-glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products. *Food Research International* 41(9):850–868.
- Izydorczyk, M.S. y Biliaderi, C.G. 1995. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*. 28(1):33–48.
- Izydorczyk, M.S. y Biliaderis, C.G. 2007. Arabinoxylans: Technologically and nutritionally functional plant polysaccharides. En C.G. Biliaderis y M.S. Izydorczyk (Eds.). *Functional Food Carbohydrates*. CRC Press, Boca Raton, 249–290 pp.
- Jia, Y., He, Y. y Lu, F. 2018. The structure-antioxidant activity relationship of dehydrodiferulates. *Food Chemistry* 269:480–485.
- Kale, M.S., Yadav, M.P., Chau, H.K. y Hotchkiss, A.T. 2018. Molecular and functional properties of a xylanase hydrolysate of corn bran arabinoxylan. *Carbohydrate Polymers* 181:119–123.
- Knudsen, K.E.B. y Laerke, H.N. 2010. Rye arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties and physiological effects in the gastrointestinal tract. *Cereal Chemistry* 87(4): 353–362.
- Koegelenberg, D. y Chimphango, A.F.A. 2017. Effects of wheat-bran arabinoxylan as partial flour replacer on bread properties. *Food Chemistry* 221:1606–1613.
- Kucharzik, T., Hudson, J.T., Lügering, A., Abbas, J.A., Bettini, M., Lake, J.G. y Williams, I.R. 2005. Acute induction of human IL-8 production by intestinal epithelium triggers neutrophil infiltration without mucosal injury. *Gut* 54(11):1565–1572.

- Lagaert, S., Pollet, A., Delcour, J.A., Lavigne, R., Courtin, C.M. y Volckaert, G. 2010. Substrate specificity of three recombinant α -l-arabinofuranosidases from *Bifidobacterium adolescentis* and their divergent action on arabinoxylan and arabinoxylan oligosaccharides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 402(4):644–650.
- Li, W., Zhang, S. y Smith, C. 2015. The molecular structure features-immune stimulatory activity of arabinoxylans derived from the pentosan fraction of wheat flour. *Journal of Cereal Science* 62:81–86.
- Malunga, L.N. y Beta, T. 2015. Antioxidant capacity of arabinoxylan oligosaccharide fractions prepared from wheat aleurone using *Trichoderma viride* or *Neocallimastix patriciarum* xylanase. *Food Chemistry* 167:311–319.
- Malunga, L.N., Izydorczyk, M.S. y Beta, T. 2017. Effect of water-extractable arabinoxylans from wheat aleurone and bran on lipid peroxidation and factors influencing their antioxidant capacity. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 10:20–26.
- Marquez-Escalante, J., Carvajal-Millan, E., López-Franco, Y.L., Valenzuela-Soto, E.M. y Rascón-Chu, A. 2018a. Efecto prebiótico de los arabinoxilanos y los arabinoxilo-oligosacáridos y su relación con la promoción de la buena salud / Prebiotic effect of arabinoxylans and arabinoxylan-oligosaccharides and the relationship with good health promotion. *CienciaUAT* 13(1): 146–164.
- Marquez-Escalante, J., Carvajal-Millan, E., Yadav, M.P., Kale, M., Rascón-Chu, A., Gardea-Bejar, A., Valenzuela, E., López-Franco, Y., Lizardi-Mendoza, J. y Faulds, C. 2018b. Rheology and microstructure of gels based on wheat arabinoxylans enzymatically modified in arabinose to xylose ratio. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(3):914–922.
- Marquez-Escalante, J.A. y Carvajal-Millan, E. 2019. Feruloylated arabinoxylans from maize distiller's dried grains with solubles: effect of feruloyl esterase on their macromolecular characteristics, gelling, and antioxidant properties. *Sustainability* 11(22), 6449; <https://doi.org/10.3390/su11226449>
- Marquez-Escalante, J.A., Rascón-Chu, A., Campa-Mada, A., Martínez-Robinson, K.G. y Carvajal-Millan, E. 2020. Influence of carboxymethylation on the gelling capacity, rheological properties, and antioxidant activity of feruloylated arabinoxylans from different sources. *Journal of Applied Polymer Science* 137(5), 48325. doi: 10.1002/app.48325.
- Martínez López, A.L. 2011. Características estructurales y viscoelásticas de geles de arabinoxilanos ferulados de maíz inducidos por lacasa o peroxidasa. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora.
- Martínez-López, A.L., Carvajal-Millan, E., Sotelo-Cruz, N., Micard, V., Rascón-Chu, A., López-Franco, Y.L., Lizardi-Mendoza, J. y Canett-Romero, R. 2019a. Enzymatically cross-linked arabinoxylan microspheres as oral insulin delivery system. *International Journal of Biological Macromolecules* 126: 952–959.
- Martínez-López, A.L., Carvajal-Millan, E., Márquez-Escalante, J., Campa-Mada, A.C., Rascón-Chu, A., López-Franco, Y.L. y Lizardi-Mendoza, J. 2019b. Enzymatic cross-linking of ferulated arabinoxylan: Effect of laccase or peroxidase catalysis on the gel characteristics. *Food Science and Biotechnology* 28(2): 311-318.
- Melo-Silveira, R.F., Viana, R.L.S., Sabry, D.A., da Silva, R.A., Machado, D., Nascimento, A.K.L.,

- Scortecchi, K.C., Ferreira-Halder, C.V., Sassaki, G.L. y Rocha, H.A.O. 2019. Antiproliferative xylan from corn cobs induces apoptosis in tumor cells. *Carbohydrate Polymers* 210:245–253.
- Mendez-Encinas, M.A., Carvajal-Millan, E., Rascon-Chu, A., Astiazaran-Garcia, H.F. and Valencia-Rivera, D.E. 2018. Ferulated arabinoxylans and their gels: functional properties and potential application as antioxidant and anticancer agent. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Volume 2018, Article ID 2314759. doi: 10.1155/2018/2314759.
- Mendez-Encinas, Mayra A., Carvajal-Millan, E., Yadav, M.P., López-Franco, Y.L., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Brown-Bojórquez, F., Silva-Campa, E. y Pedroza-Montero, M. 2019a. Partial removal of protein associated with arabinoxylans: Impact on the viscoelasticity, crosslinking content, and microstructure of the gels formed. *Journal of Applied Polymer Science* 136(15), 47300. <https://doi.org/10.1002/app.47300>.
- Mendez-Encinas, M. A., Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., López-Franco, Y. L., y Lizardi-Mendoza, J. 2019b . Arabinoxilanos y la relación de la fracción proteica remanente con la capacidad gelificante del polisacárido / Arabinoxylans and the remaining protein fraction relationship with the gelling capability of the polysaccharide. *Acta Universitaria* 29, e1755. <http://doi.org/10.15174.au.2019.1755>.
- Mendez-Encinas, M.A., Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., Astiazarán-García, H., Valencia-Rivera, D.E., Brown-Bojorquez, F., Alday, E. y Velazquez, C. 2019c. Arabinoxylan-based particles: in vitro antioxidant capacity and cytotoxicity on a human colon cell line. *Medicina-Lithuania* 55, 349; doi:10.3390/medicina55070349.
- Mendis, M., Leclerc, E. and Simsek, S. 2016. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydrate Polymers* 139:159–166.
- Morales-Burgos, A.M., Carvajal-Millan, E., Rascón-Chu, A., Martínez-López, A.L., Lizardi-Mendoza, J., López-Franco, Y.L. y Brown-Bojórquez, F. 2019. Tailoring reversible insulin aggregates loaded in electrosprayed arabinoxylan microspheres intended for colon-targeted delivery. *Journal of Applied Polymer Science* 136(38), 47960. doi: 10.1002/APP.47960.
- Morales-Ortega, A., Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Gardea-Béjar, A., Torres-Chávez, P., López-Franco, Y., Rascón-Chu, A. y Lizardi-Mendoza, J. 2013. Ferulated arabinoxylans from cereals. A review of their physico-chemical characteristics and gelling capability. *Revista Fitotecnica Mexicana* 36(4):439–446.
- Morales-Ortega, A., Carvajal-Millan, E., Brown-Bojórquez, F., Rascón-Chu, A., Torres-Chávez, P., López-Franco, Y.L., Lizardi-Mendoza, J., Martínez-López, A.L. y Campa-Mada, A.C. 2014. Entrapment of probiotics in water extractable arabinoxylan gels: Rheological and microstructural characterization. *Molecules* 19(3):3628–3637.
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Rascón-Chu, A., Márquez-Escalante, J. A., Guerrero, V. y Salas-Muñoz, E. 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochemistry* 9(1):111–120.
- Pang, G., Wang, F. y Zhang, L.W. 2018. Direct killing or immunoregulatory effects of natural polysaccharides in cancer treatment. *Carbohydrate Polymers* 195:243–256.
- Papon P.J., Leblond, P.M. y Meijer, P.H.E. 2006. Gelation and transitions in biopolymers. En: P.J. Papon, PM Leblond y P.H.E. Meijer (eds.). *The Physics in Phase Transition. Concepts and*

Applications, 2nd ed. Springer-Verlag, New York, 189-213 pp.

- Paz-Samaniego, R., Méndez-Encinas, M., Fierro-Islas, J.M., Marquez-Escalante, J., Rascón-Chu, A., Martínez-Lopez, A.L. y Carvajal-Millan, E. 2015. Ferulated arabinoxylans recovered from low-value maize by-products: Gelation and antioxidant capacity. En: Warren, B. (Ed.). *Ferulic Acid: Antioxidant Properties, Uses and Potential Health Benefits*. Nova Science Publisher, Inc., New York, 151-164 pp.
- Peñarrieta, J.M, Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J.L, y Bravo, J.A. 2014. Phenolic compounds in foods. *Handbook of Food Analysis Second Edition: Physical Characterization and Nutrient Analysis* 31(2):68–81.
- Peña-Torres, E.F., González-Ríos, H., Avendaño-Reyes, L., Valenzuela-Grijalva, N.V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazán, A. y Peña-Ramos, E.A. 2019. Hydroxycinnamic acids in animal production: Pharmacokinetics, pharmacodynamics and growth promoting effects. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 10(2):391–415.
- Pérez-Flores, J.G., Contreras-López, E., Castañeda-Ovando, A., Pérez-Moreno, F., Aguilar-Arteaga, K., Álvarez-Romero, G.A. y Téllez-Jurado, A. 2019. Physicochemical characterization of an arabinoxylan-rich fraction from brewers spent grain and its application as a release matrix for caffeine. *Food Research International* 116:1020–1030.
- Pérez-Martínez, A., Valentín, J., Fernández, L., Hernández-Jiménez, E., López-Collazo, E., Zerbes, P., Schwörer, E., Nuñez, F., Martín, I.G., Sallis, H., Díaz, M.A., Handgretinger, R. y Pfeiffer, M.M. 2015. Arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) enhances natural killer cell-mediated cytotoxicity against neuroblastoma in vitro and in vivo. *Cytotherapy* 17(5):601–612.
- Pollet, A., Delcour, J.A. y Courtin, C.M. 2010. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. *Critical Reviews in Biotechnology* 30(3):176–191.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F. y Firuzi, O. 2013. Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure-Activity Relationships. *Current Medicinal Chemistry* 20(36):4436–4450.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9-10):1231–1237
- Rosa, N.N., Dufour, C., Lullien-Pellerin, V. y Micard, V. 2013. Exposure or release of ferulic acid from wheat aleurone: impact on its antioxidant capacity. *Food Chemistry* 141(3):2355–2362.
- Ross-Murphy, S.B. 1984. Rheological methods. En H.W.S. Chan (Ed.). *Biophysical Methods in Food Research*. Alden Press, Oxford, 138–199 pp.
- Sandberg, J.C., Björck, I.M. y Nilsson, A.C. 2017. Effects of whole grain rye, with and without resistant starch type 2 supplementation, on glucose tolerance, gut hormones, inflammation and appetite regulation in an 11–14.5 hour perspective; a randomized controlled study in healthy subjects. *Nutrition Journal* 16, 25, <https://doi.org/10.1186/s12937-017-0246-5>.
- Sarma, S. M., Singh, D. P., Singh, P., Khare, P., Mangal, P., Singh, S. y Kondepudi, K.K. 2018. Finger millet arabinoxylan protects mice from high-fat diet induced lipid derangements,

inflammation, endotoxemia and gut bacterial dysbiosis. *International Journal of Biological Macromolecules* 106:994–1003.

- Saulnier, L., Guillon, F., Sado, P. y Rouau, X. 2013. Plant Cell Wall Polysaccharides in Storage Organs: Xylans *Molecular Sciences and Chemical Engineering*. En: Kamerling, H (eds). *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. Elsevier, Oxford, 653–689 pp.
- Selinheimo, E., Autio, K., Kruus, K. y Buchert, J. 2007. Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(15):6357–6365.
- Shyama Prasad Rao, R., Sai Manohar, R. & Muralikrishna, G. 2007. Functional properties of water-soluble non-starch polysaccharides from rice and ragi: Effect on dough characteristics and baking quality. *Food Science and Technology* 40(10):1678–1686.
- Singh, R. D., Banerjee, J. y Arora, A. 2015. Prebiotic potential of oligosaccharides: A focus on xylan derived oligosaccharides. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 5:19–30.
- Slavin, J. 2003. Why whole grains are protective: biological mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society* 62(1):129–134.
- Vogel, B., Gallaher, D. D., & Bunzel, M. 2012. Influence of cross-linked arabinoxylans on the postprandial blood glucose response in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(15):3847–3852.
- Wang, J., Bai, J., Fan, M., Li, T., Li, Y., Qian, H., Wang, L., Zhang, H., Qi, X. y Rao, Z. 2020. Cereal-derived arabinoxylans: Structural features and structure–activity correlations. *Trends in Food Science and Technology* 96:157–165.