

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

**CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y VISCOELÁSTICAS DE GELES
DE ARABINOXILANOS FERULADOS DE MAÍZ INDUCIDOS POR LACASA O
PEROXIDASA**

POR

ANA LUISA MARTÍNEZ LÓPEZ

TESIS APROBADA POR LA

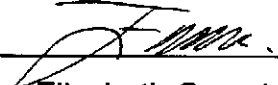
COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Ana Luisa Martínez López, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Elizabeth Carvajal Millán
Directora de tesis



Dr. Jaime Lizardi Mendoza



Dra. Yolanda López Franco



Dr. Agustín Rascón Chu

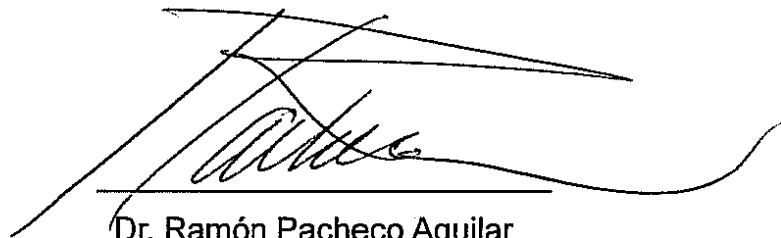


Dra. Erika Salas Muñoz

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin el permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el 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 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD, AC).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa aprobación por escrito del Director de la tesis.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ramón Pacheco Aguilar', is written over a horizontal line. The signature is stylized and extends to the right of the line.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por otorgarme la beca durante los estudios del programa de maestría en ciencias.

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

A la Dra. Elizabeth Carvajal Millán, directora de esta tesis, por concederme el honor de formar parte de su grupo de investigación, compartir su conocimiento y experiencia para la realización de este trabajo; y sobre todo, por brindarme su amistad y su gran calidez humana. *Muchas gracias!*

A mi comité de tesis Dr. Agustín Rascón Chu, Dra. Yolanda L. López Franco, Dra. Erika Salas Muñoz y Dr. Jaime Lizardi Mendoza, por su aportación y apoyo en la realización de este trabajo.

A Q.B. Alma C. Campa Mada y Q.B. Karla G. Martínez Robinson por el apoyo técnico durante el desarrollo de este trabajo.

A toda la comunidad CIAD Hermosillo por el apoyo brindado en la realización de este trabajo.

A mis grandes amigos Sarahi Rangel, Jorge Márquez, Ana Luque y Vania Urías por abrazar un secreto convirtiéndose en cómplices, por sus consejos en decisiones difíciles, por duplicar la felicidad y dividir mis tristeza y sobre todo por creer en mí. *Gracias, porque es difícil encontrar un buen amigo, más difícil dejarlo e imposible olvidarlo.*

DEDICATORIAS

A Dios:

Por ser el pilar de mi vida, por otorgarme salud, amor y ser siempre la luz que me guía en cada paso que doy.

A mis padres:

María Trinidad López y Esteban Martínez, por su apoyo en todo momento, sus consejos, sus valores y su motivación constante, y por ser un ejemplo de perseverancia y constancia. Pero sobre todo, por su amor.

A mis hermanos:

Paulina, Claudia, Esteban y César quienes siempre me han brindado su amor, confianza, apoyo y amistad.

A mi Tohui por aguantar las horas de estudio y desvelos.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
RESUMEN.....	X
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPITULO II. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	5
Arabinosilanos del pericarpio de maíz.....	5
Extracción.....	5
Estructura molecular.....	6
Residuos de monosacáridos y enlaces glucosídicos	6
Ácido ferúlico y entrecruzamiento molecular.....	7
Peso molecular.....	9
Propiedades Fisicoquímicas	10
Solubilidad.....	10
Viscosidad intrínseca.....	10
Hidrogeles covalentes	11
Gelificación	11
Reacciones de acoplamiento oxidativo de los AXF.....	11
Agentes oxidantes enzimáticos.....	13
Estructura.....	16
Contenido de uniones covalentes	17
Características estructurales.....	18
Características viscoelásticas.....	19
CAPITULO III. EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN, Y PROPIEDADES DE GELIFICACIÓN DE LOS ARABINOXILANOS FERULADOS PROVENIENTES DE PERICARPIO DE MAIZ NIXTAMALIZADO	
Resumen	21
Introducción.....	23
Materiales.....	25

Métodos.....	25
Extracción de los arabinosilanos ferulados (AXF).....	25
Azúcares neutros	25
Proteína.....	26
Cenizas	26
Contenido de ácido ferúlico sus dímeros y trímeros en AXF.....	26
Peso molecular viscosimétrico	27
Viscosidad intrínseca.....	27
Gelificación de los AXF-PN.....	27
Reología de baja deformación	27
Análisis estadístico.....	27
Resultados y Discusión	28
Extracción y caracterización de los AXF-PN.....	28
Gelificación y contenido de uniones covalentes	29
Conclusiones.....	31

CAPITULO IV. ENTRECruzamiento ENZIMÁTICO DE ARABINOXILANOS FERULADOS: EFECTO DE LA ENZIMA EN LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y REOLÓGICAS DEL GEL

Resumen	33
Introducción.....	34
Materiales	36
Métodos.....	36
Gelificación de AX.....	36
Estructura del gel	36
Reología dinámica de alta deformación	37
Reología dinámica de baja deformación	37
Contenido de ácido ferúlico, sus dímeros y trímeros en los geles...	37
Análisis Estadístico.....	38
Resultados y Discusión.....	39
Parámetros estructurales.....	39
Características viscoelásticas.....	40
Contenido de uniones covalentes en el gel.....	41
Conclusiones.....	45
 BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	 46

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Esquema simplificado de la estructura de los AX del pericarpio de maíz	8
Figura 2.2 Estructura de dímeros y trímero de ácido ferúlico identificados en geles de AX	12
Figura 4.1. Cinética de gelificación de la solución de AXF-PN al 4% (p/v) inducida por lacasa y el sistema POD/H ₂ O ₂	44
Figura 4.2. Espectro de frecuencia de los geles de AXF-PN al 4% (p/v) formados por lacasa y el sistema POD/H ₂ O ₂	45

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 2.1. Sistema enzimático para la generación de radicales libres.....	16
Cuadro 2.2. Parámetros estructurales de los geles inducidos por lacasa	19
Cuadro 3.1. Composición de los AX-PN.....	32
Cuadro 4.1. Efecto del tipo de enzima en la estructura y propiedades reológicas del gel de AXF-PN	43

RESUMEN

Los arabinoxilanos ferulados (AXF) son polisacáridos capaces de formar geles covalentes por acción de agentes oxidantes como la lacasa y la peroxidasa. Dicha oxidación favorece el acoplamiento de las cadenas de arabinoxilanos mediante la formación de dímeros (di-AF) y trímeros (tri-AF) de ácido ferúlico, dando lugar al gel. Las propiedades funcionales del gel de arabinoxilanos dependen de sus características estructurales y viscoelásticas. El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del tipo de enzima entrecruzante en las características estructurales y viscoelásticas del gel de arabinoxilanos ferulados del pericarpio de maíz provenientes de un proceso de nixtamalización (AXF-PN). En este estudio fueron extraídos y caracterizados AXF-PN utilizando condiciones alcalinas suaves. Los AXF-PN extraídos presentaron una pureza del 85 % (p/p), una relación A/X de 0.75, un contenido de ácido ferúlico de 0.25 µg/mg, una viscosidad intrínseca de 268 mL/g y un peso molecular de 197 kDa. Se evaluó la capacidad de gelificación de los AXF-PN utilizando lacasa o peroxidasa como agente entrecruzante. Los parámetros estructurales de los geles de AXF-PN inducidos con lacasa o peroxidasa presentaron diferencias ($p < 0.05$) en el tamaño de poro (ϵ) con valores de 178 y 193 nm, respectivamente. Los AXF-PN entrecruzados con lacasa presentaron mayor firmeza (H) y elasticidad (G') del gel (37.2 N, 530 Pa, respectivamente) en comparación a los inducidos con peroxidasa (7.4 N y 180 Pa, respectivamente). En ambos tipos de geles de arabinoxilanos el dímero mayoritario fue el 8-5'. Sin embargo, el di-AF 5-5' se encontró en mayor proporción en el gel inducido por peroxidasa. Estos resultados indican que los geles de AXF-PN inducidos por lacasa o peroxidasa presentan propiedades estructurales y reológicas distintas.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

En la actualidad existe una tendencia mundial hacia el aprovechamiento de los recursos naturales mediante la obtención de biopolímeros y principios activos para su utilización en la industria alimenticia, biotecnológica y/o farmacéutica. En este contexto, los arabinosilanos ferulados (AXF) son polisacáridos neutros no amiláceos extraídos de cereales, bambú y cáscara de plátano, entre otros (Niño-Medina *et al.*, 2010). Los AXF poseen propiedades funcionales con aplicación en la industria alimenticia como aditivo (Trogh *et al.*, 2007; Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2007) y potencialmente en la farmacéutica como matriz de liberación controlada (Carvajal-Millan *et al.*, 2006; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009a; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009b).

El pericarpio de maíz es un subproducto del proceso de molienda en la producción de harina para la industria tortillera en México, del cual se han recuperado AXF con propiedades de gelificación (Carvajal-Millan *et al.*, 2007). Esto ha permitido el aprovechamiento de este residuo industrial dándole valor agregado y convirtiéndolo en una fuente importante de obtención de este biopolímero en el país

Una de las propiedades más importantes de los AXF es la capacidad de formar geles covalentes por acción oxidante de agentes enzimáticos como lacasas y peroxidasas. Dicha oxidación propicia el acoplamiento de las cadenas de AXF mediante la formación de dímeros y trímeros, generando una red tridimensional acuosa. Además de los enlaces covalentes (di-AF y tri-AF), la participación de interacciones físicas entre las cadenas AXF pueden contribuir

al proceso de gelificación (Vansteenkiste *et al.*, 2004; Carvajal-Millan *et al.*, 2006).

Estudios previos establecieron una relación directa entre las características estructurales y fisicoquímicas de los AXF con la estructura del gel y sus propiedades funcionales (Carvajal-Millan *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido el efecto del tipo de enzima utilizada en el proceso de gelificación sobre las características estructurales y viscoelásticas del gel.

En este trabajo de investigación se evaluó el efecto del tipo de enzima utilizada como agente entrecruzante (lacasa o sistema H₂O₂/peroxidasa) en las características estructurales y viscoelásticas de un sistema modelo de gel de arabinosilanos del pericarpio de maíz.

Como resultado de este trabajo de tesis se han obtenido los siguientes productos:

Artículos en revistas arbitradas e indizadas

Martinez-Lopez, A.L. Carvajal-Millan, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascon-Chu, A., Lopez-Franco Y. L., Salas-Muñoz E. Peroxidase induced oxidative coupling of maize bran arabinosilans: Rheological and structural properties. *Journal Molecules*, en preparación.

Capítulo del libro

Ana L. Martínez-López, Elizabeth Carvajal-Millan, Jaime Lizardi-Mendoza, Agustín Rascón-Chu, Erika Salas-Muñoz, Yolanda L. López-Franco. Ferulated arabinosilans as a by-product from maize wet-milling process: characterization and gelling capability. In "Maize: Cultivation, Uses and Health Benefits".

Editores: Nadya Gotsiridze-Columbus. Nova Science Publishers, en preparación.

Participación en congresos

XV Reunión universitaria de Investigaciones en Materiales RUIM 2010, “Acoplamiento oxidativo vía enzimática de arabinosilanos ferulados: impacto de la enzima en las propiedades estructurales y reológicas del gel”. Martínez-López, A.L. Carvajal-Millan, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., López-Franco Y., Salas-Muñoz E, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, Diciembre 2010. Presentación en cartel

Congreso Internacional Frontiers in polymer science Second international Symposium in association with the journal polymer. “Enzymatic cross-linking of ferulated arabinosylans: Impact of the enzyme on the gel structural and rheological properties”. Martínez-López, A.L. Carvajal-Millan, E., Micard V., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., López-Franco Y., Salas-Muñoz E., Lyon, France. Mayo 2011. Presentación en cartel.

Simposium internacional sobre tecnologías convencionales y alternativas en el procesamiento del maíz. “Ferulated arabinosylans as a by-product from maize wet-milling process: characterization and gelling capability”. Martínez-López, A.L. Carvajal-Millán, E., Lizardi-Mendoza, J., Rascón-Chu, A., López-Franco Y., Salas-Muñoz E., SITCAMAIZ, Chihuahua, Chih. Agosto 2011. Presentación en cartel.

Este trabajo de tesis forma parte de un proyecto de investigación realizado en CIAD

Estudio de las propiedades funcionales de geles de arabinosilanos ferulados de pericarpio de maíz. CONACYT. Investigación Científica Básica, 2007-2010

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ARABINOXILANOS DEL PERICARPIO DE MAÍZ

El grano de maíz contiene alrededor de un 50 % de arabinoxilanos (AX), de los cuales un alto contenido se encuentra en el pericarpio (29 – 30 %). Además contiene una cantidad significativa de ácidos fenólicos (~ 4 %) (Saulnier *et al.*, 1995b). Otros compuestos orgánicos como celulosa (~ 20 %), lignina (~ 10 %), almidón (9 %), proteínas estructurales (~ 5 %), lípidos (3 %) y cenizas (2 %), también están presentes en el pericarpio de maíz (Hespell, 1998). Dado que los AX son el componente mayoritario en el pericarpio de maíz, este material vegetal se considera una fuente importante de obtención de este polisacárido.

Se ha reportado que los arabinoxilanos del pericarpio de maíz están conformados de D-xilosa (48 – 54 %), L-arabinosa (33 – 35 %), galactosa (5 – 11 %), ácido D-glucurónico (3 – 6 %) y polifenoles (0.6 – 2 %). El contenido y distribución de estos constituyentes en la cadena principal dependerá de la variedad de maíz y del método de extracción (Barakat *et al.*, 2007; Rose *et al.*, 2010).

Extracción

El aislamiento de los AX de los diferentes tejidos vegetales implica una extracción acuosa, química y/o enzimática de este polímero, la cual depende de la localización e interacciones con otros componentes de la pared celular. En el pericarpio del maíz los AX se encuentran localizados en los tejidos secundarios

unidos covalentemente a proteínas, lignina y otros polisacáridos de la pared celular (Lapierre *et al.*, 2001; Piber y Koehler, 2005). Este entrecruzamiento con los componentes de la pared celular permite formar un tejido estructural que no es soluble en un medio acuoso. En dicha red también participan interacciones físicas que pueden conferir resistencia e insolubilidad, debido al gran número presente en la pared celular (García-Lara *et al.*, 2004). Entonces, los AX no pueden ser fácilmente extraídos del pericarpio con métodos acuosos. Éstos requieren tratamientos más severos con soluciones ácidas o alcalinas, para poder ser liberados del tejido estructural e hidrolizado en cadenas más cortas. Una vez aislados de la pared celular del pericarpio, los AX son solubles en agua (Ishii, 1997; Saulnier *et al.*, 1999a).

Existen diferentes métodos para la extracción de AX de la pared celular del pericarpio de maíz (Chanliaud *et al.*, 1995; Saulnier *et al.*, 1995b; Barakat *et al.*, 2007). Generalmente, la extracción implica la inactivación de enzimas endógenas en medios acuosos, una hidrólisis química y el uso de enzimas hidrolíticas para eliminar almidón y proteínas del extracto. Sin embargo, los métodos de extracción difieren en tipo de hidrólisis, temperatura, porcentaje de rendimiento obtenido y en la cantidad de compuestos fenólicos recuperados. Barakat y colaboradores (2007), establecieron que el grado de hidrólisis afecta el rendimiento y contenido de ácido ferúlico, en tanto que Carvajal-Millan y colaboradores. (2007), observaron que conforme se prolongaba la extracción en condiciones controladas de álcali a temperatura ambiente, se incrementaba el rendimiento y disminuía el contenido de este ácido. La extracción con un rendimiento alto de AX con propiedades funcionales dependerá de la severidad del tratamiento, dado que el tipo de extracción influirá en las características estructuras de los AX del pericarpio de maíz (AX-PM).

Estructura molecular

Residuos de monosacáridos y enlaces glucosídicos. Los AX-PM consisten en una cadena lineal de unidades de β -(1 \rightarrow 4)-D-xilanopiranosas (*Xilp*) con ramificaciones de α -L-arabinofuranosas (*Araf*), α -D-galactopiranosas (*Galp*) y ácido α -D-glucorónico (*aGlc*). Sin embargo, los últimos dos se encuentran en menor proporción (3-5 %) unidos a los residuos de *Xilp* sólo en la posición O-2. En cambio, los residuos de *Araf* pueden estar unidos en una monosustitución en la posición O-2 ó O-3 (*mXilp* 50 %), o bien en una disustitución en ambas posiciones O-2,3 (*dXilp* 20 %) a los residuos *Xilp*. Además, el 40 % de las sustituciones de *Araf* no son terminales, ya que contienen unidos residuos de monosacáridos (*Araf* o *Xilp*) o disacáridos (*Araf-Araf* o *Xilp-L-Galp*) (Chanliaud *et al.*, 1997; Saulnier *et al.*, 1995a; Allerdings *et al.*, 2006).

Dado que la arabinosa es el sustituyente principal de la cadena de xilosa se puede determinar el grado de ramificación mediante la relación arabinosa - xilosa (A/X); el valor reportado para esta estructura es de 0.77 a 0.85 (Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Agger *et al.*, 2010). Además de los enlaces glucosídicos, se ha reportado ácido acético esterificado en la posición O-3 ó O-2 de los residuos de *Xilp* de la cadena lineal. La proporción aislada de ácido acético/*Xilp* es de 0.22 (Agger *et al.*, 2010), incrementado con ello el grado de ramificación de la estructura de los AX del pericarpio de maíz. Un esquema simplificado de la estructura de AX del pericarpio de maíz se muestra en la Figura 2.1. El grado de sustitución así como la distribución de las cadenas son factores importantes en las propiedades fisicoquímicas de los AX-PM.

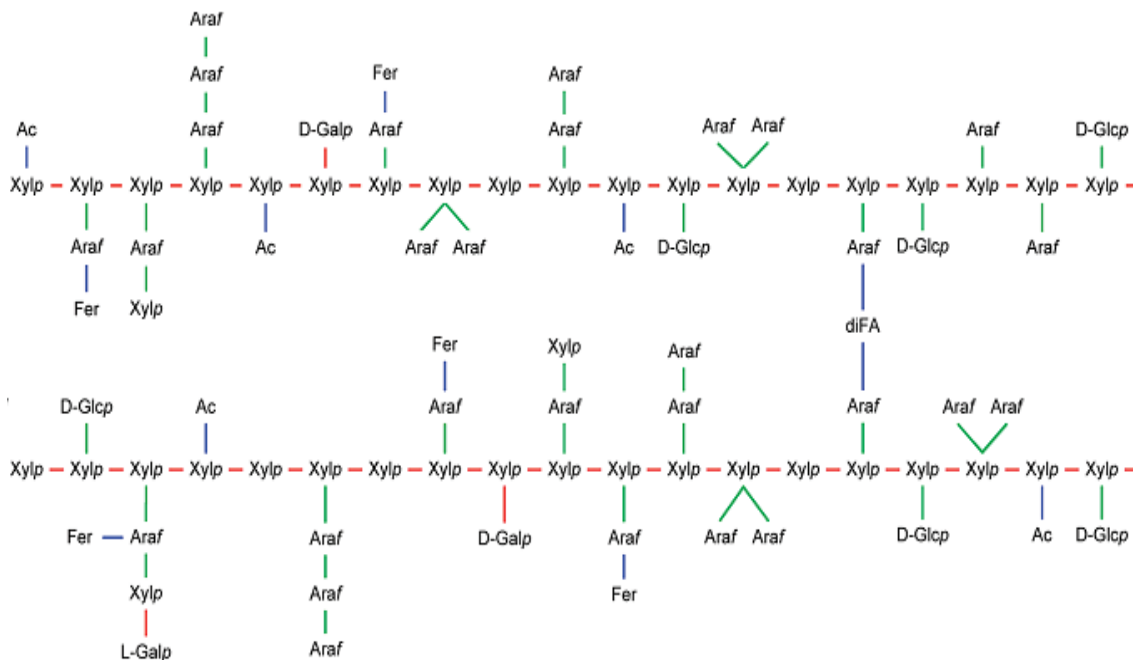


Figura 2.1. Esquema simplificado de la estructura de AX del pericarpio maíz en el que se muestran los diferentes residuos. **Xylp**: xilanopiranosas; arabinofuranosas: **Araf**; galactopiranosas: **Galp**; ácido glucorónico: **D-Glcp**; ácido acético: **Ac**; ácido ferúlico: **Fer**; dímeros de ácido ferúlico: **diFA** (adaptada por Agger *et al.*, 2010).

Ácido ferúlico y entrecruzamiento molecular. Una característica particular de la estructura de los AX es la presencia de residuos de ácido ferúlico unidos covalentemente mediante enlaces éster al O-5 de la arabinosa. Aunque el ácido ferúlico es el principal compuesto fenólico estructural de los AX, se ha identificado además ácido *p*-cúmarico unido a los residuos de arabinosa en la posición O-5 (Allerdings *et al.*, 2006) (Figura 2.1).

En los AX se han aislado también cinco diferentes formas principales de dímeros de ácido ferúlico (di-FA). Esta dimerización es el resultado del grado de entrecruzamiento de las cadenas de AX-PM. Al parecer, el ácido *p*-cumárico no participa en el proceso de acoplamiento y probablemente su participación sea

exclusivamente la transferencia de radicales (Bunzel, 2010). Los di-AF detectados son el 8-8', 8-O-4', 5-5' y 8-5', siendo los últimos dos los que presentan mayor proporción en AX-PM (Lapierre *et al.*, 2001; Carvajal-Millan *et al.*, 2007). Además, el pericarpio de maíz contiene estructuras superiores de ácido ferúlico entre las que se encuentran 6 trímeros (tri-AF) y 2 tetrámeros (tetra-AF). Los tri-AF aislados son 5-5'/8-O-4', 8-5'/8-O-4', 8-8'c/8-O-4', 8-5nc/5-5' 8-O-4'/8-O-4' y 8-8'/5-5', y los tetra-AF son 4-O-8'/5-5'/8-O-4' y 4-O-8'/5-5'/8-5'nc. La proporción de estas estructuras asociada a los AX aún no ha sido reportada (Bunzel, 2010). La concentración del ácido ferúlico y sus derivados en la estructura del AX-PM dependerá del tipo de extracción.

En AX-PM se han reportado cantidades de ácido ferúlico de 0.6 a 3.5 mg/g de arabinoxilanos y de ácido cumárico de 0.55 mg/g (Bunzel *et al.*, 2005; Barakat *et al.*, 2007). Esta concentración es comparable con AX del pericarpio del centeno, el cual tiene un alto contenido de AF (4.42 mg/g) y cumárico (0.32 mg/g) (Izydorczyk y Dexter, 2008). La proporción de di-AF, tri-AF reportada en la estructura del AX-PM es de 0.77 a 1 mg/g y 0.39 a 0.42 mg/g (Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Barakat *et al.*, 2007). Estas cantidades corresponden a cerca de 20 residuos de AF por cada 1000 residuos de xilosa y posiblemente a 5 puentes de di-AF que entrecruzan las cadenas de AX (Saulnier *et al.*, 1995b; Barakat *et al.*, 2007) (Figura 2.1).

Peso molecular. La longitud de la cadena es una característica importante de las propiedades fisicoquímicas de un polímero (Saulnier *et al.*, 2007). Ésta se relaciona con la masa molecular en peso (M_w) y el índice de polidispersión (I). El estudio de estos parámetros permite conocer el comportamiento en solución de los AX e interpretar sus propiedades en términos moleculares. La M_w varía dependiendo del origen y método utilizado para su extracción (Niño-Medina *et al.*, 2010). En AX-PM se ha reportado un rango de 200-270 KDa con un índice de polidispersión de 1.18-1.36 ($I = M_w/M_n$) (Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Barakat

et al., 2007). Es decir, presentan una alta heterogeneidad en el tamaño de las cadenas considerando la posible degradación de ésta durante la extracción

Propiedades Fisicoquímicas

Solubilidad. La solubilidad en agua del polímero depende del equilibrio entre las interacciones de corto y largo alcance. Factores estructurales como la longitud de la cadena, el grado de sustitución y su distribución, modifican dicho equilibrio y el comportamiento de la solubilidad de los AX. Por ejemplo, estudios anteriores han demostrado que una proporción A/X menor a 0.43 da lugar a la agregación y precipitación del polímero. Este fenómeno es atribuido a interacciones entre las regiones no sustituidas de la cadena de xilosa, como sucede con la estructura de la celulosa y otros polímeros poco solubles en agua (Dervilly-Pinel *et al.*, 2005; Saulnier *et al.*, 2007). Los AX-PM tienen una relación A/X de ~ 0.85 , que conduce a una mayor solubilidad. Ahora bien, este parámetro también es afectado, en menor medida, por el grado de entrecruzamiento presente en los AX (Saulnier *et al.*, 1995b).

Viscosidad intrínseca $[\eta]$. Es un parámetro que indica el volumen hidrodinámico ocupado por un polímero. Depende del peso molecular y la conformación del polímero en el solvente. La $[\eta]$ para AXF-PM presenta un valor promedio de 208 mL/g, menor que el reportado para AX del endospermo del trigo (400 mL/g). Esto es debido a la reducción del tamaño durante el proceso de extracción, que no sucede con los AX provenientes de distintos endospermos (Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Dervilly-Pine *et al.*, 2001).

Las características estructurales y fisicoquímicas de los AXF-PM, descritas en este apartado, juegan un papel muy importante en la capacidad de gelificación, dado que definirán los parámetros estructurales, reológicos y propiedades funcionales del gel formado.

Hidrogeles Covalentes

Los hidrogeles de arabinosilanos son neutros, sin color ni olor y debido a la presencia de enlaces covalentes son poco afectados por cambios de temperatura, fuerza iónica o pH (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). También presentan alta capacidad de absorción de agua y una estructura macroporosa (Carvajal-Millan *et al.*, 2005c). Estos hidrogeles tienen un gran potencial de aplicación tecnológica dado que son geles fuertes, se forman rápidamente, son termoestables y no presentan sinéresis después de tiempos de almacenamiento prolongados (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Vansteenkiste *et al.*, 2004). Además, por su naturaleza de fibra dietaria, pueden ser utilizados en el transporte de macromoléculas susceptibles a degradación durante el procesamiento de alimentos o en la digestión enzimática (Carvajal-Millan *et al.*, 2005b; Fauls *et al.*, 2006). Ahora bien, estas propiedades dependen del proceso de gelificación y de las características estructurales del gel.

Gelificación

La formación de hidrogeles de AX fue estudiada por primera vez por Geissmann y Neukom (1973). Estos autores demostraron que para poder formarse el gel se requería de dos procesos. Primero, la formación de radicales fenoxilo mediante un agente oxidante y segundo, el entrecruzamiento de las cadenas de AXF por el acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico (Ishii, 1997).

Reacción de acoplamiento oxidativo de los AXF: El ácido ferúlico propicia reacciones de acoplamiento oxidativo entre las cadenas del polisacárido, mediante su polimerización (Niño-Medina *et al.*, 2010). Estos mecanismos se llevan a cabo bajo la acción oxidante de tipo químico o enzimático sobre el ácido ferúlico, lo cual conduce a la producción de radicales libres por la

deslocalización electrónica en la posición 4-O, C-5 o C-8 (Ishii, 1997). Posteriormente ocurren procesos de acoplamiento entre los radicales resultando en la formación de dímeros (di-AF) y trímeros (tri-AF) de ácido ferúlico que unen las cadenas de polisacárido, creando una red tridimensional acuosa (Figuroa-Espinoza y Rouau, 1998).

Se han identificados cinco formas isoméricas de di-AF en geles de arabinosilanos: 5-5', 8-5' benzo, 8-O-4', 8-5' y 8-8' (Ralph et al., 1994) y sólo un trímero: 4-O-8', 5-5'' dehidrotriferulico (Carvajal-Millan *et al.*, 2005a) (Figura 2.2). Esta polimerización se ve influenciada por el tipo de solvente, concentración de la enzima y estructura del AXF (Carunchio *et al.*, 2001). Por lo tanto, la proporción de cada una de estas estructuras va estar definida por estos parámetros.

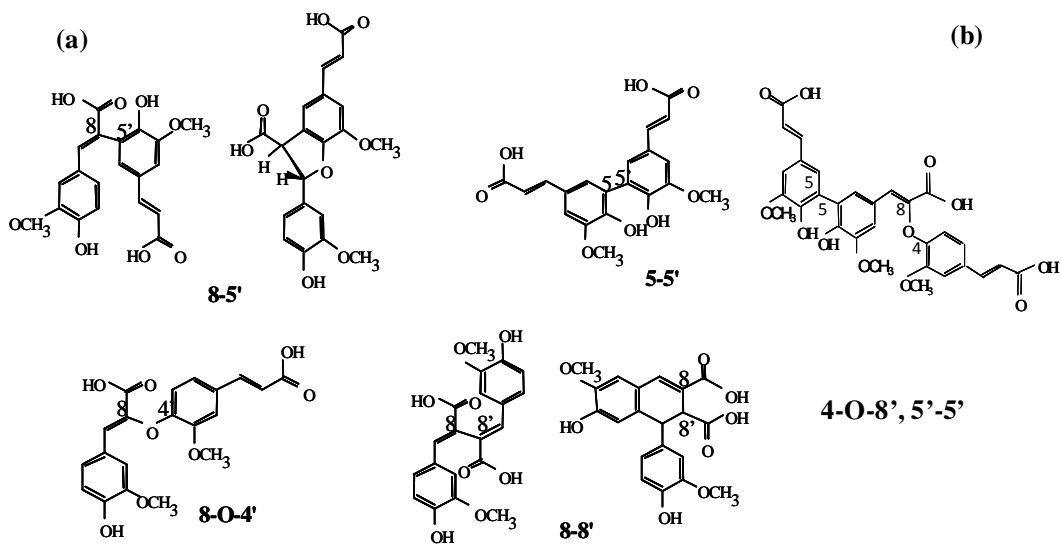


Figura 2.2. Estructuras de dímeros (a) y trímero (b) de ácido ferúlico identificados en geles de arabinosilanos

Agentes oxidantes enzimáticos. El proceso de gelificación de los AX requiere la participación de un agente entrecruzante que permita la oxidación del ácido ferúlico. Se han investigado mecanismos de oxidación tipo químico y enzimático. La gelificación enzimática es la más estudiada en AX de distinta fuente, ya que permite establecer una relación directa entre actividad del agente oxidante y el nivel de entrecruzamiento (Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999). Estas enzimas pertenecen a la categoría de las oxidorreductasas, del tipo peroxidasa (EC 1.11) y polifenol oxidasas (EC 1.10).

Las peroxidasas son hemoproteínas que catalizan reacciones en presencia de peróxido de hidrógeno, por ejemplo, el acoplamiento oxidativo de fenoles; no obstante, tienen baja especificidad por el sustrato (Durán y Esposito, 2000). Algunas enzimas pertenecientes a este grupo son la lignina peroxidasa (LiP), lactoperoxidasa (LPO), peroxidasa de rábano (POD), cloroperoxidasa (CPO) y manganeso peroxidasa (MnP) (Van Deuzen *et al.*, 1997).

La capacidad de oxidación y el poder catalítico de estas enzimas dependen de sus características estructurales (Van de Velde *et al.*, 2001). Esta diversidad estructural se debe a la proteína (que controla parte del potencial de oxidación de la enzima) y a la estructura del grupo hemo que contiene diferentes tipos de metales. Lo anterior conduce a diferencias en la actividad de agua y pH cerca al centro activo de la enzima (Davin *et al.*, 1997; Laurenti *et al.*, 2000).

Las peroxidasas, en su centro activo, pueden dirigir el acoplamiento de los radicales fenoxilo a una combinación específica dependiendo de las características del sistema (solvente, pH y concentración del sustrato). Por lo tanto, puede variar el tipo y concentración de dímeros formados dependiendo del sistema de gelificación (Veitch, 2004). La capacidad de acoplamiento oxidativo en AX utilizando peroxidasas ha sido estudiada solamente para POD (Vansteenkiste *et al.*, 2004; Boerium *et al.*, 2004) y MnP (Figuroa-Espinosa *et al.*, 1999c). La POD ha sido ampliamente estudiada para demostrar su papel en

la reticulación de la pared celular, dado que se considera la principal responsable de la polimerización de compuestos fenólicos (Ralph *et al.*, 2004). Mientras que la MnP se ha estudiado en la asociación de los monololes en la estructura de lignina (Hofrichter, 2002).

Las polifenol-oxidasas son un grupo de enzimas oxidorreductasas que también catalizan la oxidación de compuestos fenólicos. Se clasifican en dos subclases: las lacasas y las tirosinasas; ambos grupos reaccionan en presencia de oxígeno y a diferencia de las peroxidadasas no requieren cofactores (Durán y Esposito, 2000). Sin embargo, la tirosinasa aún no se ha probado como agente entrecruzante para el acoplamiento oxidativo en sistemas modelos de AX. Cabe mencionar que, a diferencia de las lacasas, la especificidad de esta enzima se reduce a monofenoles con la posición (o) libre y o-difenoles (Rodríguez-López *et al.*, 2001).

La lacasa es una cuproproteína que presenta cuatro átomos de cobre, los cuales son fundamentales para su sitio catalítico. Además, cuenta con amplia especificidad por el sustrato para los compuestos fenólicos. En general, participa en la lignificación de la pared celular del tejido vegetal, así como en procesos de fitopatogenicidad en diversos hongos (Durán *et al.*, 2002; Carunchio *et al.*, 2001). La capacidad de gelificación de esta enzima ha sido anteriormente estudiada por Figueroa-Espinosa *et al.* (1999a) y Carvajal-Millan *et al.* (2005a).

Sin duda, la actividad y la estabilidad de dichas enzimas en el proceso de generación de radicales libres depende de la estructura y concentración del sustrato, el tipo de disolvente, la fuerza iónica y el pH (Laurenti *et al.*, 2000). Por ejemplo, un estudio con POD demostró que se requería una fuerza iónica mínima a fin de inducir el entrecruzamiento y que con la disminución del pH hubo un pequeño aumento en la actividad de polimerización. Ambos efectos podrían deberse a la presencia de residuos de ácido glucurónico en la estructura del AX debido a que su desprotonación causa la repulsión

electrostática entre las cadenas. Además, podría deberse también a cambios en el sitio catalítico de la enzima (Burr y Fry, 2009).

Otros estudios demostraron que la concentración y tiempo de exposición de la enzima influía en la estabilidad del gel, sugiriendo que los radicales producidos causaban la ruptura en los puntos de entrecruzamiento y en la columna vertebral AX. Por ejemplo, Schooneveld-Bergmans y colaboradores (1999), observaron descensos en la viscosidad de AX durante la formación del gel, cuando utilizaban altas concentraciones del sistema POD/H₂O₂. En tanto que Carvajal-Millan y colaboradores (2005a) investigaron la estabilidad de los geles de AX del endospermo de trigo inducidos por el sistema lacasa/O₂ durante 6 días a 25 °C, encontrando que la dureza del gel es afectada por el envejecimiento (43 % de disminución en 6 días). En ese estudio se observó que la inactivación térmica de la lacasa después de la formación de gel restableció el contenido de di-AF y la dureza del gel provocada por el envejecimiento.

Para el proceso de generación de radicales libres en la estructura de AX se han utilizado diferentes sistemas enzimáticos, con resultados positivos en la formación del gel. Estos sistemas varían en, por lo menos, una de las siguientes características: el tipo y fuente de la enzima, concentración y estructura del sustrato, tipo de disolventes, fuerza iónica y pH (Cuadro 2.1). Por ello, no es posible establecer un punto de comparación sobre la cual enzima genera mayor acoplamiento oxidativo de las cadenas de AXF (los datos de dímeros se muestran más adelante).

Cuadro 2.1. Sistemas enzimáticos para la generación de radicales libres en AXF a 25°C

Enzima	Origen	pH	Buffer	Conc. ^a	H ₂ O ₂ ^b	Ref
Lacasa/O ₂	<i>P. cinnabarinus</i>	5	Acetato de sodio 0.1N	0.05		[1]
Lacasa/O ₂	<i>P. cinnabarinus</i>	5	Citrato-Fosfato 0.05M	1.675		[2]
Lacasa /O ₂	<i>T. versicolor</i>	5	Citrato-Fosfato 0.05M	1.675		[3]
POD/H ₂ O ₂	<i>Rábano Tipo I</i>	5	Acetato de sodio 0.1N	0.221	0.019	[4]
POD/H ₂ O ₂	<i>Rábano Tipo I</i>	6	Fosfato de sodio 0.1 M	0.145	0.005	[5]
POD/H ₂ O ₂	<i>Rábano Tipo II</i>	6	Fosfato de sodio 0.1 M	0.2505	0.023	[6]
MnP/ H ₂ O ₂	<i>P. chysosporium</i>	5	Acetato de sodio 0.1N	N.R*	NR*	[7]

^a Concentración de la enzima por mg de AXF (nKat/mg) ^b Concentración de peróxido de Hidrógeno por miligramo de AXF (μmol/mg) * Datos no reportados

[1] Vansteenkiste *et al.*, 2004; [2] Carvajal-Millan *et al.*, 2006; [3] Niño-Medina *et al.*, 2009; [4] Figueroa-Espinosa *et al.*, 1999b; [5] Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999; [6] Bunzel *et al.*, 2008; [7] Figueroa-Espinosa *et al.*, 1999a.

Estructura

A diferencia de muchos hidrogeles de polisacáridos, la estructura del gel de AX está determinada por el establecimiento de estos enlaces covalentes (di-AF y tri-AF) y la participación de interacciones físicas entre las regiones lineales de xilosa (Vansteenkiste *et al.*, 2004; Carvajal-Millan *et al.*, 2005a b c, 2006). Lo anterior definirá los parámetros estructurales y propiedades viscoelásticas del gel formado. Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, la estructura de los AXF también tiene una marcada influencia en las características del gel.

Contenido de uniones covalentes. El contenido de enlaces covalentes en el gel está determinado por la polimerización del AF y se puede cuantificar mediante la formación de di-AF y tri-AF (Carvajal-Millan *et al.*, 2005c). Los parámetros que influyen en este proceso fueron descritos en secciones anteriores de este escrito.

Los dímeros detectados en AXF son los mismos que se reportan en la estructura del gel AXF y se extraen a partir de una hidrólisis alcalina suave. Las cuatro isoformas de dímeros han sido reportadas en los geles de AX inducidos por las distintas enzimas estudiadas. Sin embargo, la proporción detectada en los geles difiere con los parámetros establecidos en el sistema de gelificación (Cuadro 2.1). Por ejemplo, para geles de AX de trigo inducidos por POD/H₂O₂, se reporta una proporción de 5:3:1:1 para 8-5', 8-O-4', 8-8' y 5-5', respectivamente (Schooneveld-Bergmans *et al.*, 1999). Sin embargo, para esta misma enzima se han reportado también proporciones de di-AF de 4:3:2:1, en el mismo orden anterior (Vansteenkiste *et al.*, 2004). En geles de arabinosilanos de maíz inducido por lacasa/O₂ el di-AF mayoritario es 5-5' (Carvajal-Millan *et al.*, 2007), mientras que en geles de trigo inducidos por este sistema el di-AF mayoritario fue 8-5' (Lapierre *et al.*, 2001).

Se debe tener en cuenta el hecho de que el tipo de enzima puede tener efectos notables e inesperados en la producción de dímeros (estéreo selectiva) durante el acoplamiento oxidativo de fenoles. Los efectos de los disolventes orgánicos en la actividad catalítica y la especificidad de sustrato también deben ser considerados en la catálisis enzimática (Carunchio *et al.*, 2001). Actualmente, se conoce la formación de un trímero de ácido ferúlico (tri-AF) (ácido 4-O-8'/5'-5'' dehidrotriferúlico) en geles de arabinosilanos de trigo y de maíz inducidos por el sistema lacasa/O₂, aunque en concentraciones más bajas que los dímeros de ácido ferúlico (Carvajal-Millan *et al.*, 2005c y 2007).

Durante el proceso de gelificación, los monómeros de ésteres del ácido ferúlico desaparecen dado que se convierten en dímeros y/o trímeros. Sin

embargo, las concentraciones de dímeros y trímeros son insuficientes para explicar la disminución de ácido ferúlico en el gel formado, de donde se han sugerido algunos mecanismos para explicar dicho fenómeno. Uno de ellos es la formación de estructuras superiores que no pueden ser liberadas por la hidrólisis alcalina suave (Lapierre *et al.*, 2001).

Por ejemplo Bunzel (2010) reporta cinco trímeros y dos tetrámeros de ácido ferúlico en pericarpio de maíz, diferentes a los reportados en geles de arabiloxilanos. Carvajal-Millan *et al.* (2007), reportaron que en geles de AX-PM formados por lacasa, más del 90 % del ácido ferúlico inicialmente presente en el polisacárido es oxidado y sólo un 15 % es cuantificado en forma de di-AF y tri-AF. Lo anterior podría indicar que los nuevos tri-AF y tetra-AF reportados por Bunzel (2010), están presentes en dichos geles de arabinosilanos de pericarpio de maíz.

Otra posible explicación es la participación de residuos de lignina en la formación del gel. Lapierre *et al.* (2001), sugiere que el entrecruzamiento de las cadenas de AXF del pericarpio de maíz no implican exclusivamente ácido ferúlico, sino también unidades de la lignina. Esto coincide con lo reportado en la formación de la pared celular, donde los ésteres de ácido ferúlico copolimerizan la unidades de lignina (Grabber *et al.*, 2000).

Lo anterior sugiere que la gelificación inducida con distintas enzimas o bien las diferencias estructurales en diversas fuentes de AX conducen a la formación de distintos isómeros de di-AF en geles de AX. Sin embargo, se requieren mayores estudios para explicar esto.

Características estructurales Los parámetros estructurales del gel son el tamaño de poro (ξ), el peso molecular (M_c) y densidad (ρ_c) entre dos puntos de unión. Estos se determinan mediante el método de retención de agua en equilibrio y en base a la teoría de Flory-Rehner modificada por Peppas y Merrill (1943), para geles formados en solución. Los cuales permiten inferir a cerca del

grado de entrecruzamiento generado durante el proceso de gelificación (Carvajal-Millan *et al.*, 2005b c).

Los geles de AX-PM presentan una red tridimensional diferente a lo reportado en geles de trigo inducidos también por lacasa, como se muestra en el Cuadro 2.2. Los valores del ξ , \overline{M}_c fueron menores mientras que el valor de ρ_c fue mayor indicando una estructura más compacta. El contenido de enlaces covalentes permanece constante con la concentración, en cambio los parámetros estructurales varían considerablemente, indicando la participación de interacciones físicas u otras estructuras en la formación de puntos de unión (Berlaga-Reyes *et al.*, 2009a). No obstante, estas variaciones estructurales en concentraciones semejantes de AX se pueden deber a la diferente estructura de AX y/o a la distinta lacasa utilizada.

Las diferencias en las características estructurales de los geles se refleja en sus propiedades funcionales como capacidad de carga y liberación de proteínas de peso molecular (Mw), que van desde 43 hasta 669 kDa (Carvajal-Millan *et al.*, 2005c; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009b).

Cuadro 2.2. Parámetros estructurales de geles inducidos por lacasa

Enzima	Fuente	% AX (w/v)	di-FA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	tri-FA ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	ξ (nm)	$\overline{M}_c \times 10^3$ (g/mol)	$\rho_c \times 10^6$ (mol/cm ³)
<i>T. versicolor</i> ^a	Maíz	2.5	0.029	0.014	80	31	49
<i>T. versicolor</i> ^a	Maíz	3.5	0.030	0.020	48	20	75
<i>P. cinnabarinus</i> ^b	Trigo	2	0.029	0.013	305	145	12

^aBerlanga Reyes *et al.*, 2009a; ^b Carvajal-Millan *et al.*, 2005c

Características viscoelásticas. La reología de baja deformación ha permitido seguir el desarrollo de la red tridimensional en soluciones de AXF sometidos a gelificación oxidativa. Tras la adición de un agente entrecruzante a una solución de AX, suele haber un rápido aumento del módulo de elasticidad (G') y la

consecuente disminución en el módulo de viscosidad (G''). Lo anterior se atribuye a la formación inicial de enlaces covalentes entre los residuos de ácido ferúlico de las cadenas de AX adyacentes. Posteriormente se presenta una región de meseta con muy poco aumento de G' hasta la formación de un gel maduro (Izydorczyk y Dexter, 2008).

Berlanga-Reyes *et al.* (2009a), reportan para geles al 2.5 y 3.5 % (p/v) de AX-PM inducidos por lacasa valores de G' de 11 y 20 Pa respectivamente. Además de presentar un tiempo de gelificación (t_g) de 13.6 min menor al reportado en AX de trigo al 2 % (w/v), el cual varía entre 20 a 25 min. Ellos sugieren que las variaciones en el t_g se deben a diferencias estructurales como peso molecular y contenido de ácido ferúlico en la cadena de AX.

Carvajal-Millan *et al.* (2007), reportaron que las estructuras de entrecruzamiento (di-AF y tri-AF) cuantificadas en los geles de AX no incrementaron con la concentración del arabinoxilano (1 % y 2 %); sin embargo, la G' del gel si aumentó. Una vez más se establece que los enlaces covalentes de di-AF y tri-AF participan parcialmente en la formación del gel, como también otras uniones covalentes y/o interacciones físicas están presentes en la estructura del gel. Por otra parte, se ha reportado una correlación positiva entre la G' del gel y la viscosidad intrínseca de los AX (Saulnier *et al.*, 2007), y al parecer es el principal parámetro que influye en esta característica (Dervilly-Pinel *et al.*, 2001).

Por último, cabe mencionar que existen pocos reportes acerca de la relación entre los parámetros estructurales y las características viscoelásticas de geles de AX-PM inducidos por peroxidasas. La mayoría de ensayos *in-vitro* con peroxidasas son para conocer las características de acoplamiento de la pared vegetal y no la estructura del gel.

CAPÍTULO III

EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES DE GELIFICACIÓN DE LOS ARABINOXILANOS FERULADOS PROVENIENTES DE PERICARPIO DE MAÍZ NIXTAMALIZADO

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue extraer, caracterizar y evaluar la capacidad gelificante de los arabinosilanos ferulados provenientes del pericarpio de maíz obtenido de un proceso de nixtamalización. Los arabinosilanos ferulados del pericarpio de maíz nixtamalizado (AXF-PN) fueron extraídos mediante una hidrólisis alcalina controlada. El rendimiento de la extracción fue del 18 % (p/p) en base a peso seco. Los AXF-PN presentaron una pureza del 85 % (p/p), un contenido de ácido ferúlico de 0.23 $\mu\text{g}/\text{mg}$, una relación arabinosa-xilosa (A/X) de 0.75, una viscosidad intrínseca $[\eta]$ de 268 mL/g y un peso molecular de 197 kDa. La capacidad gelificante de los AXF-PN a diferente concentración fue estudiada. La formación de los geles de AXF-PN se llevó a cabo induciendo la formación entrecruzamiento covalentes de ácido ferúlico por medio de lacasa. La firmeza del gel incrementó de 23.7 a 37.2 N, cuando la concentración del polisacárido aumentó de 3 a 4 %. Estos resultados indican que los arabinosilanos recuperados del pericarpio de maíz nixtamalizado es capaz de formar geles covalentes inducidos por lacasa, por la oxidación del ácido ferúlico. La capacidad de gelificante de los AXF-PN, así como las características reológicas del gel están directamente relacionadas con su composición y propiedades fisicoquímicas.

INTRODUCCIÓN

El proceso de molienda de maíz para la producción de harina blanca en la industria tortillera en México, genera como sub-producto el pericarpio. Éste se puede obtener a partir de una molienda seca o bien de un proceso de nixtamalización. En el proceso de nixtamalización el pericarpio es removido del grano después de un tratamiento térmico alcalino; lo cual genera la degradación parcial de su pared celular. Mientras que en el proceso de molienda seca es separado mediante un proceso mecánico, lo que permite obtener un pericarpio sin modificaciones térmicas alcalinas. El pericarpio de maíz contiene alrededor de un 30 % de arabinoxilanos y una cantidad significativa de ácidos fenólicos (~4 %) (Saulnier *et al.*, 1995b). Otros compuestos orgánicos como celulosa (~20 %), lignina (~10 %), almidón (9 %), proteínas estructurales (~5 %), lípidos (3 %) y cenizas (2 %), también están presentes en el pericarpio de maíz (Hespell 1998). Sin embargo, durante la nixtamalización el 60 % de los componentes son hidrolizados y lixiviados al nejayote (licor de cocimiento), modificando el contenido de lignina, xilosas, proteínas, ácidos fenólicos y glucorónicos presentes en el pericarpio (Arámbula-Villa *et al.*, 2001; Gutiérrez-Cortez *et al.* 2010). Del pericarpio de maíz proveniente de la molienda seca y del nejayote residuo de la nixtamalización se han recuperado arabinoxilanos ferulados con capacidad de gelificación distinta (Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Niño-Medina *et al.*, 2009).

La capacidad gelificante de los AX se ve afectada por las diferencias estructurales de los mismos, siendo estas diferencias: el peso molecular, el grado de sustitución y el contenido de ácido ferúlico. Estos parámetros varían de acuerdo a la fuente, y al método de extracción (agua, tratamiento químico o enzimático). En el pericarpio del maíz los AX se encuentran localizados en los tejidos secundarios unidos covalentemente a proteínas, lignina y otros

polisacáridos de la pared celular (Lapierre *et al.*, 2001; Piber y Koehlen, 2005). Debido a este entrecruzamiento con los componentes de la pared celular los AX requieren tratamientos con soluciones ácidas o alcalinas, para poder ser liberados del tejido estructural e hidrolizado en cadenas más cortas. Una vez aislados de la pared celular del pericarpio, los AX son solubles en agua (Ishii, 1997; Saulnier *et al.*, 1999a). El objetivo de esta investigación fue extraer, caracterizar y evaluar la capacidad gelificante de los arabinoxilanos ferulados provenientes del pericarpio de maíz obtenido de un proceso de nixtamalización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El pericarpio de maíz fue proporcionado por una industria de molienda comercial en el norte de México (Gimsa). La enzima lacasa (benzenodiol: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) de Rábano tipo I y todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU).

Métodos

Extracción de los arabinosilanos ferulados (AXF). Los AXF fueron extraídos de acuerdo a la metodología establecida por Carvajal-Millan *et al.* (2007), la cual se basa en una hidrólisis alcalina controlada, con NaOH al 0.5 N a 25° C por un periodo de 8 h en constante agitación. Los AXF extraídos fueron precipitados en etanol y secados con solventes.

Azúcares neutros. La composición de azúcares neutros en los AXF fue determinada a partir de una hidrólisis con 4 N de ácido trifluoroacético a 120 °C. La reacción fue detenida a las 4 horas mediante una cama de hielo y los extractos fueron evaporados bajo aire a 40 °C, se realizaron dos lavados con 200 µL de agua. Los extractos evaporados fueron solubilizados en 500 µL de agua. El inositol fue utilizado como estándar interno. Las muestras fueron filtradas a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm (Whatman) y analizadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna Supelcogel Pb (300 x 7.8 mm; Supelco, Inc., Bellefonte, PA), eluida con agua a un flujo de 0.6 mL/min a 80 °C; acoplada a un detector de índice de refracción Star 9040 (Varian, St. Helens, Australia).

Proteína. El contenido de proteína en los AXF fue determinado de acuerdo al método de Bradford (Bradford, 1976).

Cenizas. El contenido de cenizas fue determinado de acuerdo al método de la AOAC (Association of Official Analytical Chemistry, 2002).

Contenido de ácido ferúlico, sus dímeros y trímeros en AX. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Éstos fueron extraídos mediante un proceso de saponificación controlada y recuperación en éter de acuerdo a Vansteenkiste *et al.* (2004). A 100 mg de AXF se agregó 10 mL de NaOH 2 N en una atmosfera enriquecida con argón y se incubaron por 2 h en la oscuridad a 35 °C. Posteriormente fue adicionado 50 µg de ácido 3,4,5 trimetoxi-trans-cinámico (TMCA) como estándar interno y se ajustó el pH a 2 ± 0.2 con HCl 4 N. Los fenoles fueron extraídos dos veces con 5 mL de éter dietílico y evaporados a 30°C en presencia de argón. El extracto seco se recuperó en 1 mL de una mezcla metanol/agua (50/50), se filtró (0.45 µL) e inyectó (20 µL) en una columna Altima C18, 5 µm (250 x 4.6 mm, Alltech, Deerfield, IL). Se utilizó como fase móvil una solución reguladora de acetato de sodio 0.05M (pH 4) y acetonitrilo en elución en gradiente a un flujo de 1 mL/min a 35 °C, los gradientes fueron 15:85 hasta 35:65 en 30 min, de 35:65 a 60:40 en 0.5 min, de 60:40 a 15:85 en 4.5 min, y finalmente una proporción 15:85 durante 5 min. El equipo utilizado fue un HPLC Waters 996 (Millipore Co., Milford, MA) equipado con un detector de arreglo de diodos. La detección se realizó a 320 nm. Se utilizaron los factores de respuesta determinados por Saulnier *et al.* (1999), y Rouau *et al.* (2003).

Viscosidad intrínseca $[\eta]$. La viscosidad específica (η_{sp}) de la solución de AXF fue determinada por viscosimetría capilar utilizando un tubo capilar de Oswald (tiempo de caída del agua 75.15 s). La η_{sp} se relacionó con la concentración AXF (η_{sp}/C) para obtener la viscosidad reducida, η_{red} (ml/g), de acuerdo a Rao (1993). Posteriormente se calculó la viscosidad intrínseca $[\eta]$ (Kraemer, 1938; Mead y Fouss, 1942).

Peso molecular viscosimétrico (Mv). El peso molecular de los AXF-PN fue calculado a partir de los valores de viscosidad intrínseca mediante la ecuación de Mark-Houwink ($[\eta]= K(Mv^a)$). Se utilizaron los valores de K y a (-1.2 y 0.74, respectivamente) reportados por Dervilly-Pinel *et al.* (2001) para arabinosilanos disueltos en agua.

Gelificación de los AX El proceso de gelificación se realizó mediante una solución de AXF al 4 % (w/v) en acetato de sodio 0.1 M a pH 5. Lacasa (1.675 nkat/ mg de AXF-PN) fue adicionada como agente entrecruzante. El tiempo de formación del gel de AXF fue de 6 h a 25 °C.

Reología de alta deformación. La firmeza de los geles se determinó mediante reología de alta deformación en un analizador de textura (TA.XT2i Texture Analyzer, RHEO Stable Micro Systems, Godalming, England) de acuerdo a Urias *et al.* (2010). Los geles fueron deformados por compresión a una velocidad constante de 1.0 mm/s a una distancia de 4 mm de la superficie del gel utilizando un émbolo cilíndrico (diámetro 15 mm).

Análisis estadístico. Las determinaciones químicas se hicieron por duplicado con un índice de confiabilidad del 95 %. Las mediciones reológicas fueron realizadas por triplicado y el coeficiente de variación fue menor al 5 %. Todos los resultados son expresados con valores de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción y Caracterización de los AXF-PN

El rendimiento de la extracción de los AXF a partir del pericarpio de maíz fue del 18 % en base a peso seco (ps). Este rendimiento es menor que el reportado en AXF provenientes de pericarpio no nixtamalizado (29 % p/v) con similar método de extracción (Carvajal-Millan *et al.*, 2007). Sin embargo, el porcentaje de recuperación fue mayor que el reportado en AXF extraídos del nejayote (8 % p/v) (Niño-Medina *et al.*, 2009).

La composición de los AXF-PN se muestra en el cuadro 3.1. Los AXF-PN presentan un grado de pureza del 85 % (ps). Este valor fue estimado de la suma de arabinosa + xilosa. La proporción de arabinosa-xilosa (A/X) fue de 0.75, indicando una estructura moderadamente ramificada, resultados similares fueron reportados por Agger *et al.*, (2010) en arabinosilanos de pericarpio de maíz. Residuos de glucosa, galactosa y ácido acético fueron también detectados en este polímero. Además los arabinosilanos presentaron bajo contenido de proteína (1.46 %) y minerales (0.91 %) en comparación a lo reportado en otras fuentes de arabinosilanos ferulados de maíz (Saulnier *et al.*, 1995a; Lapierre *et al.*, 2001; Carvajal-Millan *et al.*, 2007).

El contenido de ácido ferúlico (AF) (0.25 µg/mg AXF-PN) fue similar al obtenido por Niño-Medina *et al.*, (2009) en arabinosilanos extraídos del nejayote (0.23 µg/mg). También fueron detectados di-AF y tri-AF en la estructura de los AXF-PN (0.14 y 0.07 µg/mg AXF-PN, respectivamente), lo que sugiere que algunas cadenas de arabinosilanos podrían estar intra y/o inter reticuladas. Sin embargo este contenido de di-Af y tri-AF es menor al reportado en arabinosilanos extraídos de cascarilla de maíz y subproductos de la

nixtamalización (Lapierre *et al.*, 2001; Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Niño-Medina *et al.*, 2009). Los porcentajes relativos de cada uno de los dímeros fueron: 5, 15, 80 % para 8-O-4', 5-5' y 8-5' (mayoritariamente en su forma de benzofurano), respectivamente. Estudios previos, han reportado como di-AF predominante a la estructura isomérica 5-5' en AXF provenientes de otras fuentes de maíz (Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Niño-Medina *et al.*, 2009).

Los valores de la viscosidad intrínseca (η) y el peso molecular viscosimétrico (Mv) fueron 268 mL/g y 197 kDa los cuales son más altos que los reportados en AXF extraídos del nejayote (Niño-Medina *et al.*, 2009).

Gelificación y Contenido de Uniones Covalentes

La capacidad de gelificación de los AXF-PN al 3 y 4 % (p/v) inducidos con lacasa fue evaluada mediante reología de alta de formación. La firmeza del gel incrementó de 23.7 a 37.2 N, cuando la concentración del polisacárido aumentó de 3 a 4 % de AXF-PN (p/v). Estos valores de firmeza son mayores a los reportados en geles de AX del pericarpio de maíz al 3.5 % (p/v) con similar método de extracción (0.83 N) (Carvajal-Millan *et al.*, 2007). Lo anterior podría ser explicado en base a que los AXF-PN presentan una mayor viscosidad intrínseca, menor contenido de proteína y minerales (mayor pureza); lo cual permite incrementar la participación de interacciones físicas de la red polimérica.

Al final de la gelificación, el 76 % del ácido ferúlico inicialmente presente en los AXF-PN fue oxidado mientras que solamente el 15 % fue recuperado como di-AF y tri-AF. De hecho, el contenido de di-AF y tri-AF no aumentó después de la gelificación inducida por lacasa, sus valores más bien

disminuyeron de 0.14 a 0.03 y de 0.73 a 0.007 $\mu\text{g}/\text{mg}$ AX, respectivamente. Resultados similares han sido reportados en arabinoxilanos de provenientes de sub-productos del maíz (Lapierre *et al.*, 2001; Carvajal-Millan *et al.*, 2007; Niño-Medina *et al.*, 2009). Este resultado ha sido atribuido a la formación de estructuras superiores que no pueden ser liberadas por la hidrólisis alcalina suave y/o la participación de residuos de lignina en la formación del gel.

CONCLUSIONES

Un porcentaje importante de AX con capacidad de gelificación fue recuperado del pericarpio de maíz proveniente de un proceso de nixtamalización. Los AXF-PN muestran un bajo contenido de compuestos fenólicos (di-AF y tri-AF). Las características estructurales y fisicoquímicas de los AXF-PN permitieron formar geles covalentes fuertes en presencia de lacasa. Estos geles presentan una firmeza mayor que la reportada para geles de AX extraídos del pericarpio de maíz proveniente de una molienda seca.

Cuadro 3.1 Composición de los AXF-PN

Arabinosa ^a	36.13 ± 0.58
Xilosa ^a	48.70 ± 1.06
Galactosa ^a	5.74 ± 1.13
Glucosa ^a	3.23 ± 0.32
Ácido acético	2.23 ± 0.42
Proteína ^a	1.41 ± 0.15
Cenizas	0.91 ± 0.12
Ácido cumárico ^b	0.07 ± 0.01
Ácido ferúlico ^b	0.25 ± 0.01
Dímeros de ácido ferúlico ^b	0.14 ± 0.01
Trímeros de ácido ferúlico ^b	0.07 ± 0.01

^aResultados son expresados en g/100 g AX-PN

^bLos compuestos fenolicos son expresados en µg/mg AXF-PN

Valores promedio de dos repeticiones

CAPÍTULO IV

ENTRECruzAMIENTO ENZIMÁTICO DE ARABINOXILANOS FERULADOS: EFECTO DE LA ENZIMA EN LAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y REOLÓGICAS DEL GEL

RESUMEN

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto del tipo de enzima entrecruzante en las características estructurales y viscoelásticas del gel de arabinosilanos ferulados del pericarpio de maíz (AXF-PN). La gelificación de AXF-PN se llevó a cabo induciendo la formación de entrecruzamientos covalentes de ácido ferúlico por medio de una lacasa o el sistema peroxidasa (POD/H₂O₂). Los parámetros estructurales de los geles de AXF-PN inducidos con lacasa o POD/H₂O₂ mostraron diferencias ($p > 0.05$) en el tamaño de poro (ϵ) con valores de 178 y 193 nm respectivamente. Los AXF-PN entrecruzados con lacasa presentaron una firmeza de 37.2 N y un módulo de elasticidad (G') de 530 Pa; mientras que en los geles inducidos con el sistema POD/H₂O₂ fueron de 7.4 N y 180 Pa, respectivamente. El dímero mayoritario en la estructura de ambos geles fue el 8-5', sin embargo el di-AF 5-5' se encuentra en mayor proporción en la estructura del gel inducido por POD/H₂O₂. Estos resultados indican que los geles de AXF-PN inducidos por lacasa o sistema POD/H₂O₂ presentan propiedades estructurales y reológicas distintas.

INTRODUCCIÓN

Los geles son redes tridimensionales de cadenas de polímeros reticuladas con capacidad de absorber grandes cantidades de agua hasta llegar al equilibrio sin dañar su estructura (Peppas *et al.*, 2000). Esta capacidad de hinchamiento está directamente relacionada con la estructura química, conformación molecular y el grado de entrecruzamiento del polímero. Los arabinosilanos ferulados (AXF) son polisacáridos con capacidad de formar geles covalentes por acción de agentes enzimáticos como lacasas y peroxidasa/H₂O₂ (POD/H₂O₂). Estas enzimas actúan oxidando el ácido ferúlico presente en la estructura del AX dando lugar a la formación de radicales fenoxilo (Ishii, 1997). Dicha oxidación favorece el acoplamiento de las cadenas de AX mediante la formación de dímeros y trímeros, generando una red tridimensional acuosa. Se han identificados cinco formas isoméricas de di-AF en geles de arabinosilanos: 5-5', 8-5' benzo, 8-O-4', 8-5' y 8-8' (Ralph *et al.*, 1994) y sólo un trímero: 4-O-8', 5-5'' dehidrotriferulico (Carvajal-Millan *et al.*, 2005a). Esta dimerización se ve influenciada por el tipo de solvente, concentración de la enzima y estructura del AXF (Carunchio *et al.*, 2001). Además de los enlaces covalentes (di-AF y tri-AF), la participación de interacciones físicas entre las cadenas AX pueden contribuir al proceso de gelificación (Vansteenkiste *et al.*, 2004; Carvajal-Millan *et al.*, 2006).

Los geles de AX presentan propiedades interesantes como son olor y sabor neutro, alta capacidad de absorción de agua y ser poco sensibles a los cambios de pH o fuerza iónica. La estructura macroporosa de los geles de arabinosilanos le confiere potencial de aplicación como matriz de liberación controlada de biomoléculas. Tal aplicación del gel de AX depende de sus propiedades reológicas y estructurales, las cuales se encuentran ligadas a la estructura del AX y la concentración del AX en el gel. El propósito de este trabajo es estudiar el efecto del tipo de enzima (lacasa, POD/H₂O₂) en las

características estructurales y viscoelásticas de un sistema modelo de gel de arabinosilanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los AXF del pericarpio de maíz se obtuvieron y caracterizaron como se reporta en el capítulo anterior, presentando una pureza del 85 % (p/p), una relación A/X de 0.75, un peso molecular de 197 kDa, una $[\eta]$ de 2.68 dL/g y un contenido de ácido ferúlico de 0.25 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Las enzimas comerciales de lacasa (benzenodiol: oxígeno oxidoreductasa, EC 1.10.3.2) de *Trametes versicolor* y peroxidasa (POD, donador: peróxido de hidrógeno oxidoreductasa, EC 1.11.1.7) de Rábano tipo I y todos los productos químicos fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU). La actividad de lacasa (0.083 nkat/ μL) y peroxidasa (0.166 nkat/ μL) se determinaron de acuerdo a la metodología descrita por Figueroa-Espinoza *et al.*, (1999).

Métodos

Gelificación de los AX. El proceso de gelificación se realizó mediante una solución de AXF al 4 % (w/v) en acetato de sodio 0.1 M a pH 5.5. La lacasa (1.675 nkat/mg de AXF-PN) o H_2O_2 (1.5 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ AXF-PN) + POD (1.670 PU/mg AXF-PN) fue adicionada a la solución de AXF-PN como agente entrecruzante. El tiempo de formación del gel de AXF fue de 6 h a 25 °C.

Estructura del gel. Para determinar los parámetros estructurales del gel de AXF se utilizó el método de retención de agua al equilibrio reportado por Carvajal-Millan *et al.*, (2005b). Se utilizaron 4.5 mL de azida de sodio al 0.02 % (p/v) como líquido de inmersión para evitar el crecimiento microbiano. La retención de agua al equilibrio fue calculada de acuerdo a la ecuación:

$$q = (W_s - W_{AX}) / W_{AX}$$

donde W_s es el peso de los geles al equilibrio y W_{AX} es el peso de AX en el gel (Carvajal-Millan *et al.*, 2005b).

A partir de las pruebas de retención de agua al equilibrio y en base a la teoría termodinámica de Flory-Rehner modificada por Peppas y Merrill (1943) para geles formados en solución, se determinaron los parámetros estructurales: peso molecular entre dos puntos de unión (M_c), densidad de puntos de unión (ρ_c) y tamaño de poro del gel (ξ) según Carvajal-Millan *et al.* (2005b).

Reología dinámica de alta deformación. La firmeza de los geles se determinó mediante reología de alta deformación en un analizador de textura (TA.XT2i Texture Analyzer, RHEO Stable Micro Systems, Godalming, England) de acuerdo a Urias *et al.* (2010). Los geles fueron deformados por compresión a una velocidad constante de 1.0 mm/s a una distancia de 4 mm de la superficie del gel utilizando un émbolo cilíndrico (diámetro 15 mm)

Reología dinámica de baja deformación. La formación de los geles con distinta enzima se llevaron a cabo utilizando un reómetro dinámico de baja deformación (ARES 2000, Rheometric Expansion System, Rheometric Scientific, Champ sur Marne, France) de acuerdo a Carvajal-Millan *et al.* (2005a). La cinética de gelificación de los AXF se registró durante 6 h a 25 °C. Las mediciones se realizaron a 0.25 Hz y 5 % de deformación. El espectro de frecuencia del gel se obtuvo entre 0.1 y 10 Hz a 5 % de deformación y 25°C.

Contenido de ácido ferúlico, sus dímeros y trímeros. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa. Éstos fueron extraídos mediante un proceso de saponificación

controlada y recuperación en éter de acuerdo a Vansteenkiste *et al.* (2004). Un mililitro del gel de AXF al 4 % (p/v) se agregó 10 mL de NaOH 2 N en una atmosfera enriquecida con argón y se incubaron por 2 h en la oscuridad a 35 °C. Posteriormente fue adicionado 50 µg de ácido 3,4,5 trimetoxi-trans-cinámico (TMCA) como estándar interno y se ajustó el pH a 2 ± 0.2 con HCl 4 N. Los fenoles fueron extraídos dos veces con 5 mL de éter dietílico y evaporados a 30°C en presencia de argón. El extracto seco se recuperó en 1 mL de una mezcla metanol/agua (50/50), se filtró (0.45 µL) e inyectó (20 µL) en una columna Altima C18, 5 µm (250 x 4.6 mm, Alltech, Deerfield, IL). Se utilizó como fase móvil una solución reguladora de acetato de sodio 0.05M (pH 4) y acetonitrilo en elución en gradiente a un flujo de 1 mL/min a 35°C, los gradientes fueron 15:85 hasta 35:65 en 30 min, de 35:65 a 60:40 en 0.5 min, de 60:40 a 15:85 en 4.5 min, y finalmente una proporción 15:85 durante 5 min. El equipo utilizado fue un HPLC Waters 996 (Millipore Co., Milford, MA) equipado con un detector de arreglo de diodos. La detección se realizó a 320 nm. Se utilizaron los factores de respuesta determinados por Saulnier *et al.* (1999a), y Rouau *et al.* (2003).

Análisis estadístico. Las determinaciones químicas y las pruebas de retención de agua en equilibrio se hicieron por duplicado con un índice de confiabilidad del 95 % y 92 %, respectivamente. Las mediciones reológicas fueron realizadas por triplicado y el coeficiente de variación fue menor al 10 %. La firmeza, elasticidad (G') y parámetros estructurales fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) con el tratamiento (enzimas) como factor de variación. Todos los resultados son expresados con valores de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros Estructurales

La retención de agua de los geles al 4 % (w/v) de AXF-PN inducidos por lacasa y el sistema POD/H₂O₂ en función del tiempo fue estudiada durante 24 h a 25°C. La retención de agua en el equilibrio fue alcanzada entre las 8 y 15 h (variación en el peso del gel menor al 3 %). La fracción de agua en el gel al equilibrio (q) fue de 18 y 43 g agua/g AXF-PN para los geles obtenidos por lacasa y el sistema POD/H₂O₂, respectivamente. Estas diferencias pueden estar relacionadas a la formación de una red tridimensional más compacta que limita la absorción de agua en el gel inducido por lacasa (Meyvis *et al.*, 2000). Los valores de q encontrados en los geles de AXF-PN inducidos por lacasa son similares a los reportados por Berlanga-Reyes *et al.* (2009a) en geles de AX de pericarpio de maíz al 3.5 % (w/v) formados por lacasa (20 g agua/g AX).

A partir de los datos de hinchamiento fueron calculados los parámetros estructurales de los geles de AXF-PN tratados con distinta enzima (Cuadro 4.1). Los parámetros obtenidos fueron: peso molecular entre dos puntos de unión (Mc), densidad de entrecruzamiento (ρ_c) y tamaño de poro (ξ). Los valores encontrados para Mc y ρ_c fueron similares en ambos geles, estos resultados podrían atribuirse a la presencia de una misma estructura de AXF-PN. Dado que estudios previos han demostrado que diferencias en las características estructurales de los AX modifican estos parámetros (Carvajal-Millan *et al.*, 2005c; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009a). Sin embargo, se observó diferencias significativas en el ξ mostrando un menor tamaño del poro para el gel de lacasa, lo cual confirma la presencia de un gel con estructura más compacta.

Características Viscoelásticas

Los valores de firmeza de los geles de AXF-PN al 4 % (p/v) formados con lacasa y el sistema POD/H₂O₂ son mostrados en el Cuadro 4.1. Los geles entrecruzados con lacasa presentaron mayor firmeza en comparación a los geles generados por el sistema POD/H₂O₂. La presencia de una estructura más compacta ($\xi = 178$ nm) en el gel de lacasa se manifiesta en una mayor firmeza del gel (37.2 N); mientras que el gel formado por el sistema POD/H₂O₂ presenta mayor tamaño de poro (193 nm) que se refleja en una menor firmeza del gel (7.4 N).

La formación del gel de AXF-PN al 4 % (p/v) fue estudiada mediante reología dinámica de baja deformación. La Figura 4.1 muestra el desarrollo de los módulos de almacenamiento (G') y pérdida (G'') de la solución al 4 % de AXF-PN sometido a una gelificación oxidativa por lacasa o el sistema POD/H₂O₂. Para ambos sistemas de gelificación se obtuvo un comportamiento similar con un incremento de G' en función del tiempo hasta alcanzar un *pseudo plateau*. Sin embargo, se observó diferencias ($p > 0.05$) en el tiempo de gelificación (t_g) con valores de 3.8 y 9.3 min para los geles formados por lacasa y el sistema POD/H₂O₂, respectivamente. Comportamientos similares fueron reportados por Figueroa-Espinosa *et al.* (1999a) en AX de trigo inducidos por ambas enzimas. Estos autores utilizaron el incremento de viscosidad intrínseca para medir la capacidad de gelificación encontrando un menor tiempo de gelificación para lacasa. Los valores de G' al final del experimento fueron 530 y 180 Pa, respectivamente. Perfiles similares se han obtenido previamente en arabinosilanos provenientes de endospermo y cascarilla de trigo tratados con el sistema POD/H₂O₂ y lacasa, respectivamente (Skendi *et al.*, 2011; Berlanga-Reyes *et al.*, 2011).

Los espectros mecánicos de los geles formados por lacasa o el sistema POD/H₂O₂ después de las 6 horas a 25°C se muestran en la Figura 4.2. En estos espectros 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 arabinosilanos inducidos por lacasa o el sistema POD/H₂O₂ (Carvajal-Millan *et al.*, 2005a; Berlanga-Reyes *et al.*, 2009; Skendi *et al.*, 2011). El valor de tan δ (G'/G'') calculado al final del experimento fue de 0.01, indicando la presencia de un sistema elástico covalente para ambas enzimas (Ross-Murphy, 1984).

Contenido de Uniones Covalentes en el Gel

El contenido de uniones covalentes en la estructura del gel fue determinado por la cuantificación di-AF, tri-AF al final del proceso de gelificación (Cuadro 4.1). Para ambos geles con distinta enzima se encontró un contenido de di-AF y tri-AF sin diferencias significativas. Los porcentajes relativos de los dímeros 8-O-4', 5-5' y 8-5' en la estructura del gel obtenido por lacasa fueron 8, 14 y 78 % respectivamente, mientras para el sistema POD/H₂O₂ fueron 8, 20 y 72 %. Estos resultados muestran una mayor proporción de la estructura isomérica 5-5' en el gel inducido por POD/H₂O₂. En un estudio previo, Ralph *et al.* (2004), reportaron que el dímero 5-5' participa principalmente en la formación de uniones intra-catenarias, mientras que los otros tres isómeros de di-AF unían cadenas diferentes (inter catenarias). Por lo tanto, la presencia en mayor proporción del di-AF 5-5' en el gel tratado con POD/H₂O₂, podría estar favoreciendo las uniones intra-cadena disminuyendo la continuidad de la red polimérica. Estos resultados podrían explicar en cierta parte las diferencias en el tamaño de poro y elasticidad de los geles formados con las distintas enzimas.

CONCLUSIONES

Los arabinoxilanos del pericarpio de maíz formaron geles covalentes elásticos en presencia de lacasa o POD/H₂O₂. El contenido total de estructuras de unión (di-AF y tri-AF) en los geles de AXF-PN no varía con la presencia de diferente agente entrecruzante; aún cuando los geles de AXF-PN inducidos con lacasa son más fuertes (valores más altos de G' y firmeza) y presentan menor tamaño de poro que los formados con POD/H₂O₂. En ambos tipos de geles de arabinoxilanos el dímero mayoritario fue 8-5'; sin embargo el di-AF 5-5' se encuentra en mayor proporción en el gel inducido por peroxidasa, lo cual podría favorecer la formación de uniones intra-cadena de polisacárido disminuyendo la continuidad de la red polimérica. Estos resultados confirman la participación de las uniones covalentes (di-AF) en proceso de gelificación y su efecto en las características estructurales del gel. Las diferencias en las características estructurales y viscoelásticas de los geles de AXF-PN inducidos por lacasa o POD/H₂O₂ permitirían obtener geles de arabinoxilanos con aplicaciones distintas.

Cuadro 4.1 Efecto del tipo de enzima en la estructura y propiedades reológicas del gel de AXF-PN

	Lacasa	POD/H ₂ O ₂
Mc ^a x 10 ³ (g/mol)	48 ± 1.5 a	49 ± 0.8 a
ρc ^b x10 ⁻⁶ (mol/cm ³)	29 ± 0.8 a	30 ± 1.2 a
ξ ^c (nm)	178 ± 1.1 a	193 ± 1.0 b
Firmeza (N)	37.2 ± 1.3 b	7.4 ± 2.2 a
di-AF (μg/mg AX)	0.035 ± 0.01 a	0.033 ± 0.01 a
tri-AF (μg/mg AX)	0.008 ± 0.002 a	0.006 ± 0.001 a

Valores promedio de tres repeticiones (p < 0.05)

^a Peso molecular entre dos puntos de unión

^b Densidad de entrecruzamiento

^c Tamaño de poro

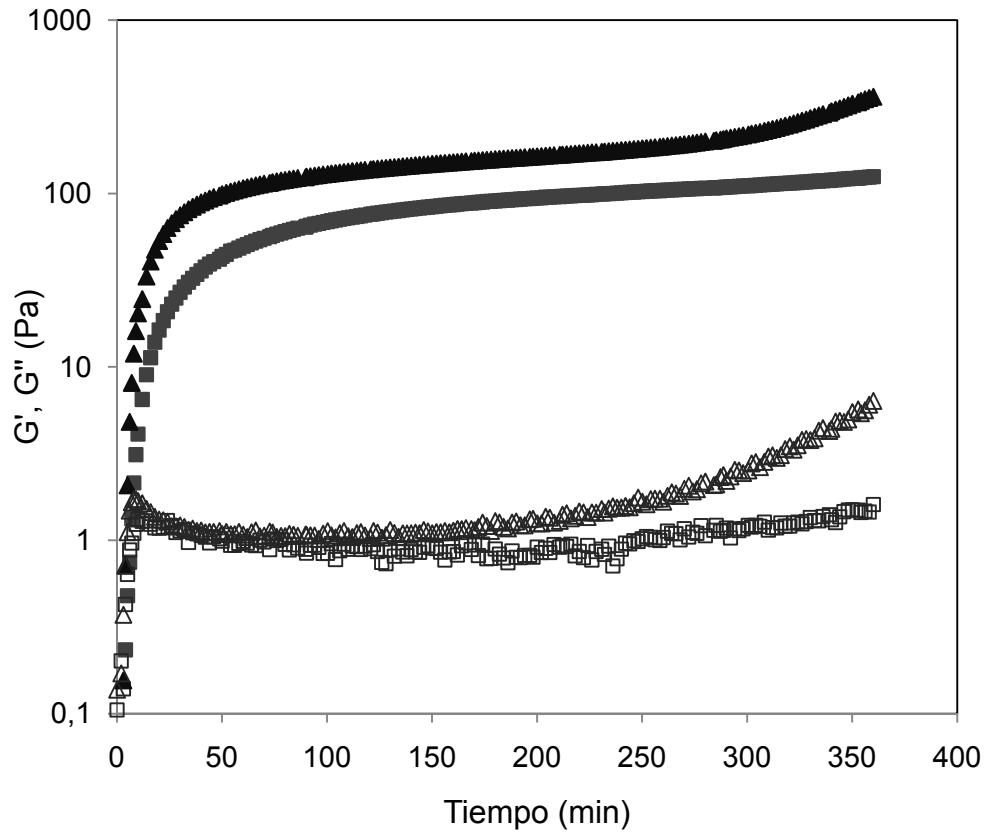


Figura 4.1. Cinética de gelificación de la solución de AXF-PN al 4% (p/v) inducida por lacasa (G' ▲, G'' △) y el sistema POD/ H_2O_2 (G' ■, G'' □). Las mediciones se realizaron a 25°C, 0.025 Hz y 5% de deformación

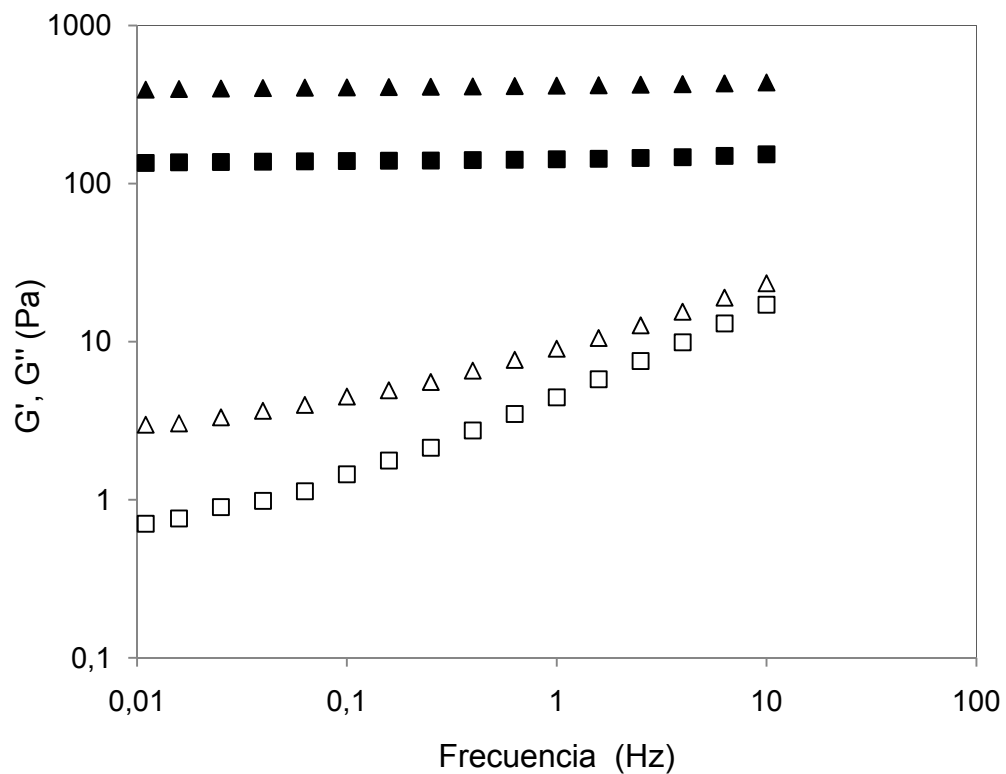


Figura 4.2. Espectro de frecuencia de los geles de AXF-PN al 4% (p/v) formados por lacasa (G' ▲, G'' △) y el sistema POD/H₂O₂ (G' ■, G'' □). Las mediciones se realizaron después de 6 h de gelificación a 25°C y 5% de deformación.

BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Agger J., Vikso-Nielsen, A., Meyer A.S., Enzymatic Xylose Release from Pretreated Corn Bran Arabinoxylan: Differential Effects of Deacetylation and Deferuloylation on Insoluble and Soluble Substrate Fractions, *Agriculture Food Chemistry*, **2010**, 58, pp 6141-6148
- Allerdings E., Ralph J., Steinhart H., Bunzel M., Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chains from maize bran *Phytochemistry*, **2006**, 67, pp 1276-1286.
- Arámbula-Villa, G., Barrón-Ávila, L., Gónzalez-Hernández, J., Moreno-Martínez, E., and Luna:Barcenas, G. Efecto del tipo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mayz* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **2001**, 51, pp 187-194
- Association of Official Analytical Chemists. In official methods of analysis of AOAC international. Arlington: AOAC International, **2002**
- Barakat A., Putaux J.-L., Saulnier L., Chabbert B., and Cathala B., Characterization of Arabinoxylan–Dehydrogenation Polymer (Synthetic Lignin Polymer) Nanoparticles, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, pp 1236–1245.
- Berlanga Reyes C., Carvajal Millán E., Niño Medina G., Rascón Chu A., Ramírez Wong B., Magaña Barajas E. (2011). Low-Value Maize and Wheat By-Products as a Source of Ferulated Arabinoxylans. In: *Waste Water-Treatment and Reutilization*. García- Einschlag, F.S. (Ed). InTech: Croatia. **2011**, ISBN: 978-953-307-249-4. pp. 341-352.
- Berlanga-Reyes C., Carvajal-Millan E., Juvera C., Rascón-Chu A., Marquez-Escalante J.E., Martínez-López A.L., Laccase Induced Maize Bran

- Arabinoxylan Gels: Structural and Rheological Properties Food Science Biotechnology, **2009a**, 18, pp. 1027- 1029
- Berlanga-Reyes, C.M.; Carvajal-Millan, E.; Lizardi-Mendoza, J.; Rascón-Chu, A.; Marquez-Escalante, J.A.; Martínez-López, A.L. Maize Arabinoxylan Gels as Protein Delivery Matrices. Molecules, **2009b**, 14, pp 1475-1482.
- Boeriu C., Oudgenoeg G., Willem Th., Spekking J., Lucienne B., Berendsen J.M., Vancon L., Boumans H., Gruppen H., Willem J. H., Berkel V., Laane C., and Voragen G., Horseradish Peroxidase-Catalyzed Cross-Linking of Feruloylated Arabinoxylans with β -Casein Journal Agriculture Food Chemistry., **2004**, 52 , pp 6633–6639.
- Bradford, M. (A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, **1976**, 72, pp 248–254.
- Bunzel M., Chemistry and occurrence of hydroxycinnamate oligomers Phytochemistry Reviews, **2010**, 9, pp 47-64.
- Bunzel M., Heuermannv B., Kim H. and Ralph J., Peroxidase-Catalyzed Oligomerization of Ferulic Acid Esters, Journal Agriculture Food Chemistry, **2008**, 56, pp 10368–10375
- Bunzel M., Ralph J., FulK C. and Steinhart H., Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran, Tetrahedron Letters, **2005**, 46, pp 5845–5850.
- Burr J. and Fry S.C., Feruloylated Arabinoxylans Are Oxidatively Cross- Linked by Extracellular Maize Peroxidase but Not by Horseradish Peroxidase Molecular Plant, **2009**, 2, pp 883–892.
- Carunchio F., Crescenzi C., Girelli A. M., Messina A., Tarola A.M., Oxidation of ferulic acid by laccase: identification of the products and inhibitory effects of some dipeptides, Talanta, **2001**, 55, pp 189-200.

- Carvajal-Millan E., Guigliarelli B., Belle V., Rouau X., Micard V., Storage stability of laccase induced arabinoxylan gels, *Carbohydrate Polymers*, **2005a**, 59, pp 181-188.
- Carvajal-Millan E., Guilbert B., Morel M.-H., Micard V., Impact of the structure of arabinoxylan gels on their rheological and protein transport properties, *Carbohydrate Polymers*, **2005b**, 60, pp 431-438.
- Carvajal-Millan E., Guilbert S., Doublier J.-L., Micard V., Arabinoxylan/protein gels: Structural, rheological and controlled release properties *Food Hydrocolloids*, **2006**, 20, pp 53-61.
- Carvajal-Millan E., Landillon V., Morel M.-H., Rouau X., Doublier J.-L., and Micard V., Arabinoxylan Gels: Impact of the Feruloylation Degree on Their Structure and Properties *Biomacromolecules*, **2005c**, 6, pp 309-317,
- Carvajal-Millan E., Rascón-Chu A., Márquez-Escalante J.A., Micard V., Ponce de León N., Gardea A., Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties, *Carbohydrate Polymers*, **2007**, 69, pp 280-285.
- Chanliaud E., Saulnier L. and Thibault J.F., Alkaline extraction and characterisation of heteroxylans from maize bran, *Journal of Cereal Science*, **1995**, 21, pp 195-200.
- Chanliaud E., Saulnier L. and Thibault J.-F., Heteroxylans from maize bran in aqueous solution. Part II: Studies of polyelectrolyte behavior, *Carbohydrate Polymers*, **1997**, 32, pp 315-320.
- Davin, L. B.; Wang, H. B.; Crowell, A. L.; Bedgar, D. L.; Martin, D. M.; Sarkanen, S.; Lewis, N. G., Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **1997**, 275, pp. 362-366.
- Dervilly-Pinel G., Rimsten L., Saulnier L., Andersson R., Åman P., Water-extractable Arabinoxylan from Pearled Flours of Wheat, Barley, Rye and Triticale. Evidence for the Presence of Ferulic Acid Dimers and their

- Involvement in Gel Formation, *Journal of Cereal Science*, **2001**, 34, pp 207-214.
- Dervilly-Pinel G., Thibault J.F., Saulnier L., Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans, *Carbohydrate Research*, **2005**, 330 pp 365-372.
- Durán N., Esposito E., Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review, *Applied Catalysis B: Environmental*, **2000**, 28, pp 83-99.
- Durán N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L., Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review, *Enzyme and Microbial Technology*, 31, **2002**, pp 907-931.
- Faulds C, Mangalari G, Lo Curto RB, Influence of the arabinoxylan composition on the susceptibility of mono- and dimeric ferulic acid release by *Humicola insolens* feruloyl esterases. *Journal Science Food Agriculture*, **2006**, 86, pp 1623–1630.
- Figuroa-Espinoza M. C. and Rouau X., Effect of Cysteinyl Caffeic Acid, Caffeic Acid, and L-Dopa on the Oxidative Cross-Linking of Feruloylated Arabinoxylans by a Fungal Laccase, *Journal Agriculture Food Chemistry*., **1998**, 47, pp 497–503.
- Figuroa-Espinoza M. C., Morel M.H., Surget A., Rouau X., 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*, **1999b**, 79, pp 460–463.
- Figuroa-Espinoza M.C., Morel M. -H., Surget A., Asther M., Moukha S., Sigoillot J.-C., Rouau X., Attempt to cross-link feruloylated arabinoxylans and proteins with a fungal laccase, *Food Hydrocolloid*, **1999b**, 13, pp 65-71

- Flory, P.J., and Rehner, J. Statistical mechanics of cross-linked polymer networks. II. Swelling. *The Journal of Chemical Physics*, **1943**, 11, pp 521-526.
- García-Lara, S., Bergvinson, D. J., Burt, A. J., Ramputh, A., Díaz-Pontones, D. M., & Arnason, J. T. The role of pericarp cell wall components in maize weevil resistance. *Crop Science*, **2004**, 44, pp 1546–1552.
- Geissman, T. and Neukom, H. On the composition of the water-soluble wheat flour pentosanes and their oxidative gelation. *Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie*, **1973**, 6, pp 59-62.
- Grabber, J. H.; Ralph, J.; Hatfield, R., Cross-linking of maize walls by ferulate dimerization and incorporation into lignin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 48, pp. 6106-6113
- Gutiérrez-Cortez, E., Rojas-Molina, I., Rojas, A., Arjona, J.L., Cornejo-Villegas, M.A., Zepeda-Benítez, Y., Velázquez-Hernández, R., Ibarra-Alvarado, C., and Rodríguez-García M.E. Microstructural changes in the maize kernel pericarp during cooking stage in nixtamalization process, *Journal of Cereal Science*, **2010**, 51, pp 81-88.
- Hespell, R.B. Extraction and characterization of hemicelluloses from the corn fiber produced by corn wet.milling processes. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, **1998**. 46, pp 2615-2619
- Hofrichter M., Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP) Enzyme and Microbial Technology, **2002**, 30, pp 454-466.
- Ishii T, Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plante Science*, **1997**, 127, pp 111–127
- Izydorczyk M.S., Biliaderis C.B., Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties, *Carbohydrate Polymers*, 28, **1995**, pp 33-48.

- Izydorczyk M.S., Dexter J.E. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review Food Research International, **2008**, 41, pp 850-868.
- Kraemer, E. O. Molecular weight of celluloses and cellulose derivatives. Industrial and Engineering Chemistry, **1983**, 30, pp 1200–1203.
- Lapierre C., Pollet B., Ralet M.-C., Saulnier L., The phenolic fraction of maize bran: evidence for lignin-heteroxylan association Phytochemistry, **2001**, 57, pp 765-772.
- Laurenti, E.; Suriano, G.; Ghibaudi, E. M.; Ferrari, R. P., Ionic strength and pH effect on the Fe (III)-imidazolate bond in the heme pocket of horseradish peroxidase: an EPR and UV-visible combined approach. J. Inorg. Biochem., **2000**, 81, pp. 259- 266.
- Mead, D. J.,; Fouss, R. M. Viscosities of solutions of polyvinyl chloride. Journal of the American Chemical Society, **1942**, 64, pp 277–282.
- Meyvis, T.K.L., De Smedt, S.C., Demeester, J. and Hennink, W.E. Influence of the degradation mechanism of hydrogels on their elastic and swelling properties during degradation, Macromolecules, **2000**, 33, pp 4717-4725.
- Niño-Medina G., Carvajal-Millan E., Lizardi J., Rascon-Chu A., Marquez-Escalante J.M., Gardea A., Martinez-Lopez A.L., Guerrero V., Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content. Food Chemistry, **2009**, 115, pp 1286-1290.
- Niño-Medina G., Carvajal-Millan E., Rascon-Chu A., Marquez-Escalante J.A., Guerrero V. y Salas-Muñoz E., Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications Phytochemistry Reviews, **2010**, 9, pp 111-121.
- Peppas, N.A., and Merrill, E.W. Poly(vinyl alcohol) hydrogels: reinforcement of radiation-crosslinked networks by crystallization. Journal of Polymer Science, **1976**, 14, pp 441-457.

- Peppas, N.A., Bures, P., Leobandung, H. and Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Europe Journal Pharmacy Biopharmacy*, **2000**, 50, pp 27-46.
- Piber, M.; Koehler, P. Identification of dehydro-ferulic acid-tyrosine in rye and wheat: evidence for a covalent cross-link between arabinoxylans and proteins. *Journal Agriculture Food Chemistry*, **2005**, 53, 5276–5284.
- Ralph, J., Quideau, S., Grabber, J., and Hatfield, R.D., Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in gras cell walls. *J. of the Chemical Society Perkin Transactions*, **1994**,1, pp 3485-3498
- Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfiel, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J.H.; Boerjan, W., Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenylpropanoids. *Phytochemistry Reviews*. **2004**, 3, pp. 29-60.
- Rao, M. V. S. Viscosity of dilute to moderately concentrated polymer solutions. *Polymer*,**1993**, 34, pp 592–596.
- Rodríguez-López J. N., Fenoll L. G., Peñalver M. J., P. A. García-Ruiz, Varón R, Martínez-Ortíz F., García-Cánovas F., Tudela J., Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Protein Structure and Molecular Enzymology*, **2001**, 1548, pp 238-256.
- Rose D. J., Patterson J.A. and Hamaker B. R., Structural Differences among Alkali-Soluble Arabinoxylans from Maize (*Zea mays*), Rice (*Oryza sativa*), and Wheat (*Triticum aestivum*) Brans Influence Human Fecal Fermentation Profiles *Journal Agriculture. Food Chemistry*, **2010**, 58, pp 493–499
- Rouau, X., Cheynier, V., Surget, A., Gloux, D., Barron, C., Meudec, E. A dehydrotrimer of ferulic acid from maize bran. *Phytochemistry*, **2003**, 63, pp 899–903.
- Saulnier L. ,Cre´peau M., Lahaye M., Thibault J.-F., Garcia-Conesa , Paul A. Kroon b, Gary Williamson Isolation and structural determination of two 5,5'-

- diferuloyl oligosaccharides indicate that maize, heteroxylans are covalently cross-linked by oxidatively coupled ferulates Carbohydrate Research, **1999a**, 320, pp 82–92.
- Saulnier L., Marot C., Chanliaud E., Thibault J.-F., Cell wall polysaccharide interactions in maize bran Carbohydrate Polymers, 26, **1995a**, pp 279-287.
- Saulnier L., Sado P.-E., Branlard G., Charmet P., Guillon F., Wheat arabinoxylans: Exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties, Journal of Cereal Science, 46, 3, **2007**, pp 261-281.
- Saulnier L., Thibault J.-F., Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans, Journal of the Science of Food and Agriculture, **1999b**, 79, pp 396- 402.
- Saulnier L., Vigouroux J., Thibault J.-F., Isolation and partial characterization of feruloylated oligosaccharides from maize bran, Carbohydrate Research, **1995b**, 272, pp 241-253.
- Schooneveld-Bergmans M. E. F., Dignum M. J. W., Grabber J. H., Beldman G., Voragen A. G. J., Studies on the oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans from wheat flour and wheat bran Carbohydrate Polymers, 38, **1999**, pp 309-317.
- Simsek S., Ohm J.B., Structural changes of arabinoxylans in refrigerated dough Carbohydrate Polymers, **2009**, 77, pp 87-94
- Trogh I., Courtin C.M., Andersson A.A.M., The combined use of hull-less barley flour and xylanase as a strategy for wheat/hull-less barley flour breads with increased arabinoxylan and (1-3) (14)- β -D-glucan levels. J Cereal Science, **2007**, 40, pp 257–267
- Urias-Orona, V., Rascón-Chu, A., Lizardi-Mendoza, J., Carvajal-Millán, E., Gardea, A.A., Islas-Rubio, A.R. Extraction, composition and functional properties of pectin from chickpea husk. In: Food Science: Research and Technology. Haghi, A.K. (ed). Apple Academic Press: New York. **2011**, ISBN: 978-1-926895-01-7. In Press.

- Van de Velde, F., Van Rantwijk, F., and Sheldon, R. A., Improving the catalytic performance of peroxidases in organic synthesis. *TRENDS Biotechnology*, **2001**, 19, pp. 73-80.
- Van Deurzen, M. P. J.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A., Selective oxidations catalyzed by peroxidases. *Tetrahedron* **1997**, 53, pp. 13183-13220.
- Vansteenkiste E., Babot C., Rouau X., Micard V., Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis, *Food Hydrocolloids*, 18, **2004**, pp 557-564.
- Veitch, N. C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochem.* **2004**, 65, pp. 249-259.
- Yadav MP, Johnston DB, Hotchkiss AT., Corn fibre gum: A potential gum arabic replacer for beverage flavor emulsification. *Food Hydrocolloid*, **2007**, 21, pp 1022-1030.