



# UNIVERSIDAD DE SONORA

---

---

DIVISIÓN DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**“EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y GELIFICACIÓN DE ARABINOXILANOS DE RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE MAÍZ: EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN EN LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS Y MICROESTRUCTURALES DE LOS GELES”**

**TESIS PROFESIONAL**

Que para obtener el título de

**INGENIERO QUÍMICO**

Presenta:

**JOSÉ MIGUEL FIERRO ISLAS**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos  
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## VOTOS APROBATORIOS

Hermosillo, Sonora, a 21 de Octubre de 2014.

**DR. MARTÍN ANTONIO ENCINAS ROMERO**  
**JEFE DEL DEPARTAMENTO**  
**INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA**

Por medio de la presente, nos permitimos informarle que los miembros del Jurado designado para revisar la Tesis Profesional "EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y GELIFICACIÓN DE ARABINOXILANOS DE RESIDUOS DE LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL DE MAÍZ: EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN EN LAS CARACTERÍSTICAS REOLÓGICAS Y MICROESTRUCTURALES DE LOS GELES", presentada por:

**JOSÉ MIGUEL FIERRO ISLAS**

La han revisado y cada uno de los integrantes da su **VOTO APROBATORIO** ya que cumple con los requisitos parciales para la obtención del Título de:

**Ingeniero Químico**

23-x-14  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. ELIZABETH CARVAJAL MILLÁN**


23-x-14

  
\_\_\_\_\_  
**DR. LUIS CARLOS PLATT LUCERO**

21-x-14

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. SYLVIA LORENIA LOPEZ MAZÓN**

23-x-14

  
\_\_\_\_\_  
**M.C. GILBERTO GARCÍA NAVARRETE**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora, por abrirme sus puertas para llevar a cabo mis estudios.

Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia así como también a todos los maestros que me apoyaron a lo largo de la carrera.

A mi directora de tesis, Dra. Elizabeth Carvajal Millán, por brindarme la oportunidad de ingresar al CIAD y realizar un proyecto de tesis a su cargo. Gracias, doctora, por todas sus enseñanzas y apoyo que me brindó durante estos meses.

Al comité de tesis: Dr. Luis Carlos Platt Lucero, M.C. Silvia Lorenia López Mazón, M.C. Gilberto García Navarrete, por su importante asesoría en la culminación de este trabajo.

Le doy gracias a Dios por permitirme desenvolverme y poder llevar a cabo este trabajo de manera positiva.

A mis padres, por ser el apoyo incondicional, por siempre estar a mi lado y alentarme a seguir adelante superando así todos los obstáculos presentes.

A la M.C. Karla G. Martínez Robinson, Q.B. Alma C. Campa Mada y M.C. Nicolás A. Rodríguez Martínez, por el apoyo técnico y consejos para poder realizar mi tesis de manera correcta.

A esas personas que conocí, y quienes fueron mis compañeros, de todos aprendí mucho: Rita Paz, Mayra Méndez, Ana Luisa Martínez y Jorge Márquez.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Específicos	
3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
3.1 Arabinoxilanos.....	4
3.1.1 Características generales.....	4
3.1.2 Estructura química.....	4
3.1.3 Características fisicoquímicas.....	6
3.1.4 Capacidad gelificante.....	8
3.2 Extracción de Arabinoxilanos.....	15
3.2.1 Arabinoxilanos solubles en agua.....	15
3.2.2 Arabinoxilanos insolubles en agua.....	15
3.3 Arabinoxilanos de Residuos Agroindustriales.....	16
3.3.1 Residuos de la molienda de trigo.....	16
3.3.2 Residuos de la nixtamalización del maíz.....	16
3.3.3 Residuos de la producción de bioetanol a partir del maíz (DDG).....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
4.1 Materia Prima.....	19
4.2 Extracción de Arabinoxilanos.....	19
4.3 Caracterización de los Arabinoxilanos.....	19
4.3.1 Contenido de azúcares neutros.....	19
4.3.2 Contenido de ácido ferúlico.....	20
4.3.3 Proteína.....	20
4.3.4 Distribución de peso molecular.....	20
4.3.5 Gelificación.....	21
4.3.6 Reología.....	21
4.3.7 Microscopía electrónica de barrido.....	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	22

5.1 Extracción de Arabinosilanos.....	22
5.2 Caracterización.....	23
5.2.1 Contenido de azúcares neutros.....	23
5.2.2 Contenido de ácido ferúlico.....	24
5.2.3 Contenido de proteína.....	25
5.2.4 Distribución de peso molecular.....	26
5.2.5 Gelificación.....	27
5.2.6 Microscopía electrónica de barrido.....	32
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	40

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Parámetros estructurales de geles de arabinoxilanos inducidos por la enzima lacasa....	14
2. Composición de azúcares en los AX a distintos tiempos de hidrólisis.....	23
3. Contenido de ácido ferúlico obtenidos en los AX a distintos tiempos de hidrólisis.....	24
4. Contenido de proteína a distintos tiempos de hidrólisis.....	25
5. Valores de distribución de peso molecular en los AX.....	26

## LISTA DE FIGURAS

Figuras	Pág.
1. Estructura química de una fracción de arabinosilanos ferulados identificados en cereales.....	5
2. Representación esquemática de la gelificación de los arabinosilanos ferulados.....	9
3. Estructura química de los dímeros (a) y trímeros (b) del ácido ferúlico, identificados en geles de arabinosilanos.....	12
4. Rendimiento de extracción de AX a partir de DDG utilizando distintos tiempos de hidrólisis alcalina .....	22
5. Análisis reológico del gel de arabinosilano.....	28
6. Cinéticas de gelificación de soluciones de arabinosilanos de DDG al 2% (p/v) a distintos tiempos de hidrólisis (A=15min, B=30min, C=60min, D=120min y E=180min).....	29
7. Barrido de frecuencia de geles de arabinosilanos de DDG al 2% (p/v) obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis (A=15min, B=30min, C=60min, D=120min y E=180min). ....	30
8. Barridos de amplitud de geles de arabinosilanos al 2% (p/v) obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis (A=15min, B=30min, C=60min, D=120min y E=180min).....	31
9. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 15 min de hidrólisis.....	33
10. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 30 min de hidrólisis.....	34
11. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 60 min de hidrólisis.....	35
12. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 120 min de hidrólisis.....	36
13. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 180 min de hidrólisis.....	37



## LISTA DE ABREVIATURAS

gr	Gramos
nm	Nanómetros
mm	Milímetros
%	Porcentaje
kDa	Kilo Dalton
mL	Militros
rpm	Revoluciones por minuto
h	Horas
min	Minutos
°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
PMv	Peso molecular viscosimétrico
G'	Elasticidad
G''	Viscosidad
Hz	Hertz
μg	Microgramos
mg	Miligramos
Pa	Pascales

## RESUMEN

Los arabinoxilanos (AX) son polisacáridos que constituyen una parte estructural de la pared celular de los cereales. Estos polisacáridos están formados por una cadena lineal de xilosas con ramificaciones de arabinosa, a las cuales puede estar esterificado el ácido ferúlico. La presencia de ácido ferúlico confiere a los AX la capacidad de formar geles covalentes mediante la oxidación por enzimas como la lacasa. Esta oxidación resulta en la formación de dímeros y trímeros de ácido ferúlico que permiten unir las cadenas de polisacárido entre sí formando un gel. Los geles de AX son neutros, sin color ni olor y debido a su naturaleza covalente, no son afectados por cambios de temperatura, fuerza iónica o pH, lo cual les confiere un gran potencial de aplicación como agentes de encapsulación y liberación controlada. El objetivo de esta investigación fue extraer y caracterizar los AX presentes en el residuo de la producción de bioetanol de maíz (DDG, Dried Distiller Grain), como una alternativa de uso para este subproducto. Se encontró que el rendimiento de extracción de AX a partir de DDG varía dependiendo del tiempo de hidrólisis alcalina utilizado. Este rendimiento aumentó de 2.5 a 4.2 (% peso AX/peso DDG) al incrementar el tiempo de hidrólisis de 15 a 120 minutos, mientras que a mayores períodos de hidrólisis (180 y 240 minutos) el rendimiento disminuyó hasta un valor de 3.6 (% peso AX/peso DDG). Así mismo, al aumentar el tiempo de hidrólisis utilizado el grado de sustitución (A/X) y el contenido de AF de los AX extraídos disminuyó de 1.21 a 0.73 y de 6.14 a 0.02  $\mu\text{g}$  AF/mg AX, respectivamente. Debido a la presencia de AF en los AX extraídos, estos polisacáridos presentaron capacidad gelificante. Los geles de AX formados presentaron valores de elasticidad ( $G'$ ) que disminuyeron de 1000 a 30 Pa conforme el tiempo de hidrólisis con que la molécula fue extraída aumentó de 15 a 180 minutos, lo cual está directamente relacionado con la disminución en el contenido de AF. Todos los geles de AX formados presentaron características viscoelásticas típicas de un gel con los valores de  $G'$  lineales e independientes de la frecuencia de deformación y los valores de viscosidad ( $G''$ ) mucho más pequeños y dependientes de la frecuencia. El análisis de microscopía electrónica de barrido indicó que estos geles presentan una estructura porosa heterogénea donde la conectividad de la red polimérica disminuye al aumentar el tiempo de hidrólisis con que se extrajo el polisacárido. Los resultados de este estudio indican que es posible obtener AX con capacidad gelificante a partir de DDG. Las características reológicas y microestructurales de los geles de AX formados depende principalmente del contenido de AF en el polisacárido. Los geles de AX elásticos y estructurados podrían tener un potencial de aplicación como sistemas encapsulantes

mientras que los geles de AX más débiles y poco estructurados podrían ser utilizados como texturizantes. Actualmente el DDG es utilizado como alimento para ganado; sin embargo, esta investigación nos indica que es posible dar un uso alternativo a este subproducto como fuente de AX con capacidad gelificante.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los AX son los principales polisacáridos no amiláceos de los granos de cereales, que se localizan en las paredes celulares del endospermo, en la capa de aleurona y en el pericarpio de los mismos. Estos polisacáridos se han reportado en los cereales más importantes como trigo, centeno, cebada, avena, arroz, sorgo y maíz, así como en algunas otras plantas (Niño-Medina et al., 2010). Los AX pueden ser solubles e insolubles en agua. Los AX solubles se localizan principalmente en endospermo mientras que los AX insolubles en agua se encuentran principalmente en el pericarpio del grano. Ciertos AX tienen la particularidad de contener ácido ferúlico esterificado a algunas arabinosas por lo cual son llamados AX ferulados. Los AX ferulados forman soluciones viscosas y pueden formar geles bajo la acción de ciertos agentes oxidantes (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Los geles de AX han despertado un gran interés debido a que presentan características interesantes como son: olor y sabor neutro, estabilidad al pH, a los cambios de temperatura y de concentración de electrolitos, así como una estructura meso y macroporosa. Estas características les confieren aplicación potencial como matrices para la liberación controlada de biomoléculas en aplicaciones alimentarias y no alimentarias, lo cual podría dar valor agregado a los cereales o subproductos de cereales de los que pueden ser extraídos estos polisacáridos (Carvajal-Millán et al., 2007; Niño-Medina et al., 2009; Berlanga-Reyes et al., 2009). Recientemente se han realizado esfuerzos enfocados a la extracción de AX ferulados a partir de subproductos de la industria procesadora de cereales, como es el pericarpio de maíz y de trigo, así como el “nejayote” que es el agua residual de la nixtamalización del maíz (Carvajal-Millán et al., 2007; Niño-Medina et al., 2009). Uno de los residuos prometedores como fuente de AX, pero no explorado en este sentido hasta el momento, son los granos de destilería (DDG, Dried Distiller Grain), los cuales son el residuo de la fermentación del almidón de los cereales mediante levaduras y enzimas, para producir etanol y dióxido de carbono. Solo una pequeña parte de los granos de destilería proviene de las destilerías de alcohol para consumo humano, la mayoría se genera en las plantas de producción de bioetanol destinado a la elaboración de mezclas gasolina-etanol (Singh et al., 2001). Si bien el DDG ha sido utilizado desde hace varias décadas por parte de los ganaderos, como un subproducto de la industria de las bebidas alcohólicas, el auge en la producción de etanol como biocombustible incrementó su producción. México es el principal importador de DDG provenientes de Estados Unidos y el volumen importado se ha incrementado en los últimos años, debido, en primera instancia, a la cercanía y a que Estados Unidos ha aumentado

su producción de etanol, lo que aumenta la disponibilidad de este subproducto. Con cada tonelada de maíz se producen aproximadamente 402 litros de etanol y 312 kg de DDG. El Departamento de Agricultura de Estados Unidos estima que en el 2019/2020 serán utilizadas 127 millones de toneladas de maíz para producir etanol; esto es un 10.3% más que en el ciclo 2009/2010 por lo que la generación de DDG irá en aumento (Hoffman y Baker, 2010). Hasta el momento, el DDG es usado como ingrediente en la elaboración de alimento para ganado y aves, así como en la acuicultura, debido a su precio competitivo y a sus valores nutritivos. No existen reportes sobre el uso de este subproducto como fuente de polisacáridos gelificantes. Así, el objetivo de esta investigación fue extraer, caracterizar y gelificar AX de DDG y evaluar el efecto del tiempo de extracción en las características reológicas y microestructurales de los geles formados. Esta investigación es pionera en explorar el DDG como fuente de AX gelificantes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

-Extraer, caracterizar y gelificar arabinosilanos de residuos de la producción de bioetanol de maíz y evaluar el efecto del tiempo de extracción en las características reológicas y microestructurales de los geles.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Extraer arabinosilanos ferulados a partir del residuo de la producción de bioetanol de maíz. (Dried Distiller Grain, DDG).
- Caracterizar los arabinosilanos ferulados extraídos considerando su composición y evaluar su capacidad gelificante utilizando una enzima como agente entrecruzante.
- Caracterizar los geles de arabinosilanos formados del punto de vista reológico y microestructural.

### 3. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

#### 3.1 Arabinoxilanos (AX)

##### 3.1.1 Características generales

Los arabinoxilanos (AX) son polisacáridos neutros no amiláceos de los granos de cereales. Algunos residuos de arabinosa se encuentran esterificados con el ácido ferúlico (ácido 3-metoxi-4-hidroxicinámico) en posición (O)-5, por lo que son llamados arabinoxilanos ferulados (Smith y Hartley, 1983). Varios subproductos del procesamiento de cereales se han investigado como posibles fuentes de arabinoxilanos ferulados con capacidad gelificante; tal es el caso de los pericarpios de maíz (*Zea mays L.*) y de trigo (*Triticum aestivum L.*), así como el “nejayote” (líquido residual de la nixtamalización del maíz). Existen algunos reportes sobre las características físico-químicas (peso molecular, viscosidad intrínseca, grado de sustitución) y funcionales (capacidad gelificante, propiedades texturizantes y emulsificantes) de arabinoxilanos ferulados extraídos del endospermo y el pericarpio de diversos cereales: trigo, centeno (*Secale cereale L. M. Bieb.*), cebada (*Hordeum vulgare L.*), maíz (*Zea mays L.*), arroz (*Oryza sativa L.*), entre otros (Rattan et al., 1994; Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millán et al., 2005, 2007).

##### 3.1.2 Estructura química

Los arabinoxilanos son un grupo heterogéneo de polisacáridos en el cual varían los patrones de sustitución y el grado de polimerización. Están formados por una cadena lineal de xilosas unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1→4), a la cual se unen residuos de arabinosas mediante enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1→3) o  $\alpha$ -(1→2), o ambos (Figura 1). La xilosa puede presentar dos grados de sustitución, de acuerdo con el número de residuos de arabinosa (monosustituído o disustituído). Además de las unidades de arabinosa es común encontrar otros sustituyentes minoritarios como son el ácido glucurónico y la galactosa (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Vinkx y Delcour, 1996).

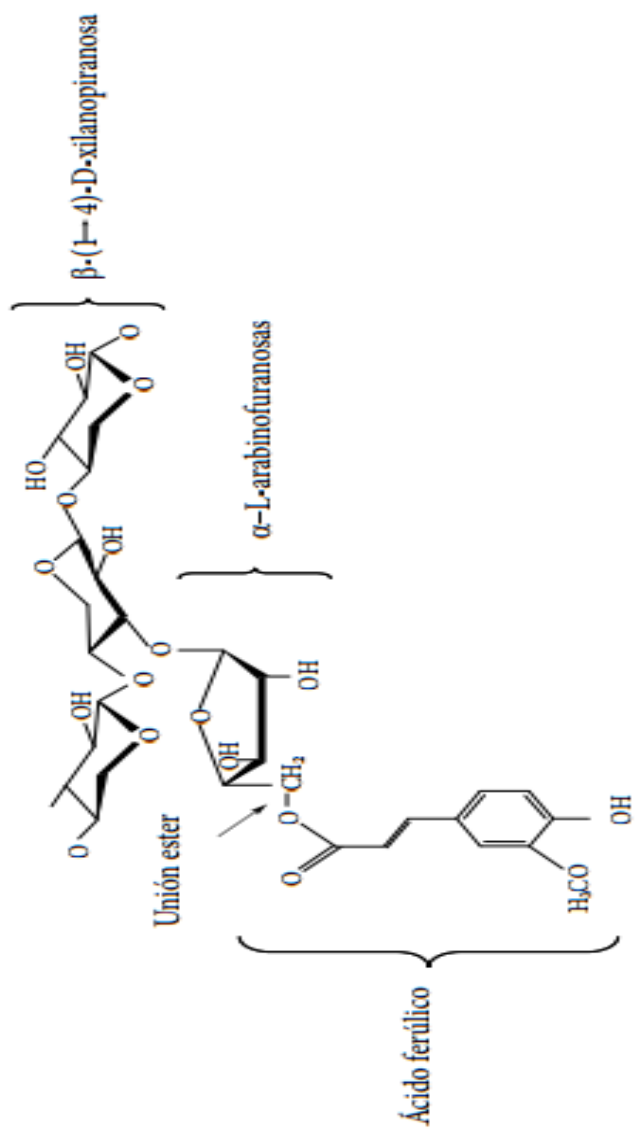


Figura 1. Estructura química de una fracción de arabinoxilanos ferulados identificados en cereales.



Los arabinoxilanos ferulados tienen la particularidad de presentar ácido ferúlico en su estructura, unido en la posición O-5 de arabinosa por medio de un enlace éster (Ishii, 1997; Saulnier y Thibault, 1999) (Figura 1). El término “grado de sustitución” utilizado en la descripción de los arabinoxilanos, se refiere al número de unidades de arabinosa unido a la cadena principal de xilosas, y también se describe como la relación arabinosa-xilosa (A/X). Tanto el grado de sustitución como la distribución de las cadenas laterales son factores importantes en las características fisicoquímicas de los arabinoxilanos (Grootaert et al., 2007).

En función de su solubilidad los arabinoxilanos se clasifican en: extraíbles en agua (WEAX, water extractable arabinoxylan) y no extraíbles en agua (WUAX, water unextractable arabinoxylan). Los WEAX son extraíbles a temperatura ambiente, mientras que los WUAX requieren de un tratamiento alcalino para su extracción. Además de su solubilidad, las principales diferencias entre los WEAX y los WUAX son que estos últimos son de un peso molecular más alto y poseen mayor diversidad en las cadenas laterales, ya que además de arabinosa contiene ácido glucorónico, galactosa y grupos acetilo (Saulnier et al., 2007). 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 arabinoxilanos en un tejido vegetal puede variar dependiendo del género, así como por los factores ambientales y los estados de desarrollo (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, cebada) que el de WUAX (20 a 30%, p/p) en el pericarpio de los mismos (Izydorczyk y Biliaderis, 2007).

### 3.1.3 Características fisicoquímicas

**Peso molecular.** Una de las variables más importantes para caracterizar una macromolécula es su peso molecular. El peso molecular de los arabinoxilanos depende de su origen y del método utilizado para su determinación. Por ejemplo, en el caso de WEAX de trigo los primeros estudios mediante técnicas de sedimentación por centrifugación reportaron valores de peso molecular muy bajos (65kDa), mientras que con cromatografía de filtración en gel se encontraron pesos moleculares muy elevados ( $\geq 800$ kDa) (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). Por su parte, Biliaderis (1995) reportó un peso molecular en el intervalo de 134 a 201 kDa en WEAX

extraídos de distintas variedades de trigo canadiense, mientras que Dervilly et al. (2000) y Dervilly-Pinel et al. (2001a; b) reportaron que el peso molecular promedio de los WEAX de trigo se encuentra entre 200 y 300 kDa. Para WUAX de pericarpio de maíz, Lapierre et al. (2001) encontraron una variación de pesos moleculares de 124 hasta 270 kDa con distintos métodos de extracción. Según Shyama y Muralikrishna (2007), el peso molecular de WEAX de arroz es de 231 kDa, que disminuye a 75 kDa después del proceso de malteado (hidrólisis enzimática del almidón del cereal).

**Solubilidad.** La solubilidad de los arabinoxilanos depende en gran medida del grado de sustitución que presenta la xilosa con unidades de arabinosa. El contenido de sustituyentes de arabinosa, así como su distribución a lo largo de la cadena de xilosa, afecta el potencial de las cadenas de arabinoxilanos para interactuar entre sí o con otros polisacáridos.

Para determinar el efecto de la sustitución de arabinosas sobre la solubilidad de los arabinoxilanos, Andrewartha et al. (1979) prepararon una serie de arabinoxilanos solubles en agua purificados de harina de trigo, en los que removieron parcialmente uniones laterales de arabinosa mediante el uso de  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa; estos autores encontraron que conforme disminuye la proporción de A/X, ocurre una disminución significativa de la solubilidad de los arabinoxilanos, y como valor crítico reportaron una proporción A/X de 0.43 a partir de la cual la solubilidad disminuye en forma abrupta.

Para los cereales (principalmente trigo, centeno, cebada, arroz, maíz) el valor A/X es generalmente más alto en los WUAX (0.6 a 0.8) que en los WEAX (0.5 a 0.7) (Izydorczyk y Biliaderis, 2007). Algunas investigaciones señalan un mayor valor de A/X en cereales cultivados bajo condiciones de estrés hídrico. Sternemalm et al. (2008) estudiaron el efecto de la sustitución de arabinosa en la solubilidad de los arabinoxilanos mediante la utilización de soluciones a 1% de arabinoxilanos 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 arabinoxilanos, y su agregación parcial se iniciaba en el rango A/X entre 0.31 y 0.23, y precipitaba totalmente a un valor A/X aproximado a 0.1. Este comportamiento se debe a que los residuos de arabinosa favorecen la interacción del polisacárido con el agua. Una vez removidas las sustituciones de arabinosa, las cadenas de xilosas pueden formar interacciones estables entre las cadenas, que confieren una conformación muy rígida a los arabinoxilanos y producen agregados insolubles.

### 3.1.4 Capacidad gelificante

**Mecanismo de gelificación.** Las soluciones acuosas de arabinosilanos ferulados tienen la característica de formar geles covalentes en presencia de agentes generadores de radicales libres. Estos agentes pueden ser enzimáticos vía lacasa/O<sub>2</sub> o peroxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figuroa Espinoza y Rouau, 1998) o químicos (persulfato de amonio y cloruro férrico) (Niño-Medina et al., 2010). Los enlaces covalentes, que unen las cadenas de arabinosilanos a través del ácido ferúlico, son los responsables de esta característica especial en el polisacárido (Figura 2). Las enzimas comúnmente utilizadas para la formación de geles de arabinosilanos son lacasa/O<sub>2</sub> y peroxidasa/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y aunque difieren los mecanismos de acción de estas dos enzimas sus productos finales son los mismos (Autio, 2006).

La catálisis enzimática de la lacasa (E.C.1.10.3.2) está basada en un mecanismo oxidativo en el que el oxígeno es el aceptor final de electrones. La lacasa cataliza la oxidación del ácido ferúlico, reacción que se encuentra acoplada a la reducción de oxígeno molecular con cuatro electrones para formar agua. Se necesita un total de cuatro moléculas de ácido ferúlico para llevar a cabo esta reacción a término (Selinheimo et al., 2007; Calcaterra et al., 2008).

La peroxidasa cataliza la oxidación del ácido ferúlico, reacción que usa al peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Esta es una reacción cíclica de tres pasos, en la cual la enzima peroxidasa (Fe<sup>3+</sup>) primero es oxidada por el peróxido de hidrógeno. Los electrones son reemplazados en dos pasos secuenciales de transferencia de un electrón, en donde el ácido ferúlico reducido se convierte en ácido ferúlico oxidado. La reacción completa utiliza dos moléculas de ácido ferúlico (Halliwell, 1978; Selinheimo et al., 2007). Es importante remarcar que tanto la lacasa como la peroxidasa-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sólo inducen la oxidación del ácido ferúlico, mientras que la formación de dímeros, trímeros y oligómeros de ácido ferúlico ocurre completamente al azar mediante un mecanismo de radicales. Debido a que los enlaces que unen las cadenas de arabinosilanos por medio del ácido ferúlico son de tipo covalente, estos geles se encuentran clasificados como geles químicos, lo que les confiere la particularidad de ser irreversibles (Papon et al., 2006).

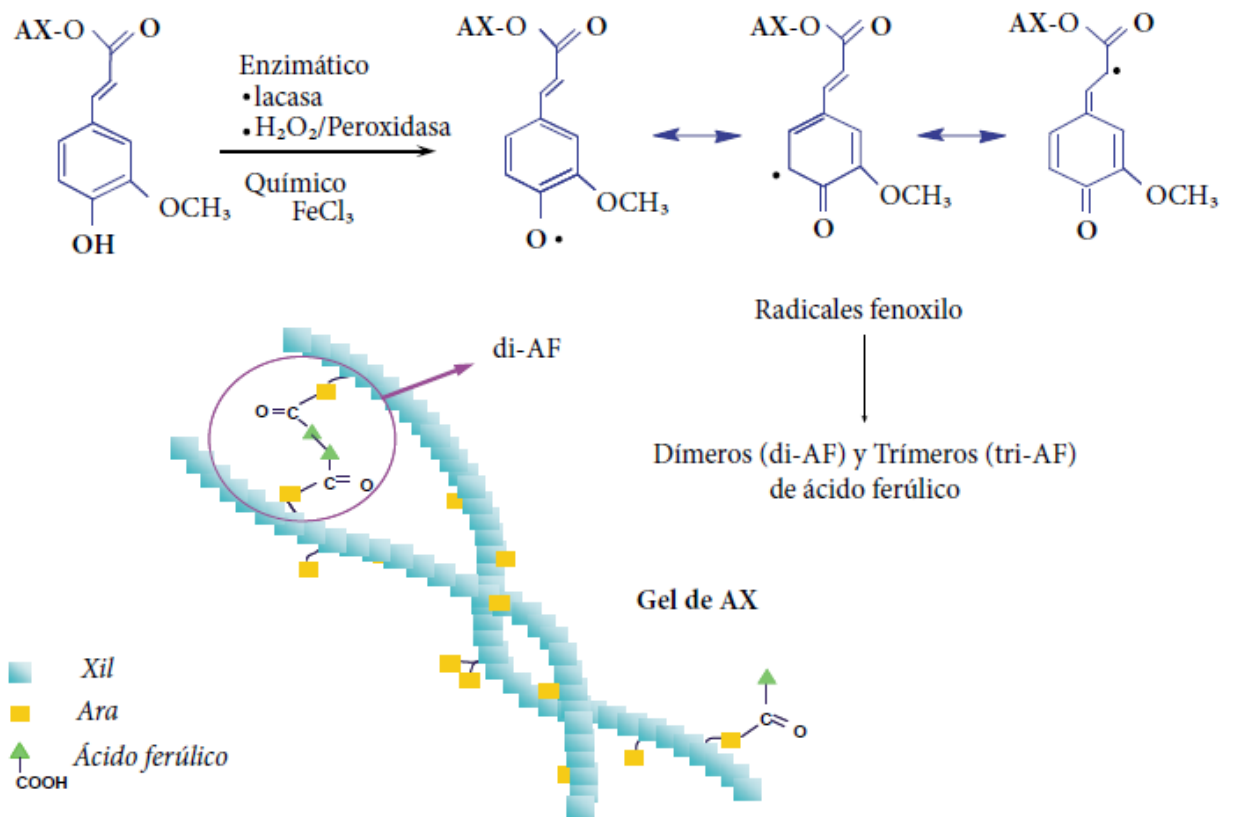


Figura 2. Representación esquemática de la gelificación de los arabinoxilanos ferulados.

**Características de los geles de arabinosilanos.** Estos geles 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). Carvajal-Millan et al. (2006) evaluaron las propiedades estructurales y reológicas de geles de arabinosilanos preparados mediante la acción de la enzima lacasa, y concluyeron que estas características pueden ser controladas mediante la modificación química del contenido de ácido ferúlico del arabinosilano. La deferulación parcial de los arabinosilanos reduce el contenido de enlaces covalentes en el gel, lo cual se refleja en la disminución del módulo elástico y el incremento en el tamaño de poro del gel. Una disminución de 40% del contenido inicial de ácido ferúlico reduce hasta 89% la elasticidad del gel formado (Carvajal-Millan et al., 2005). A concentraciones de arabinosilanos mayores de 1% (p/v), no hay incremento en el contenido de dímeros y trímeros de ácido ferúlico, aun cuando el módulo elástico continúa incrementando y el tamaño de poro de la red disminuye, lo cual denota la acción de otras estructuras ferúlicas que crean los enlaces covalentes o interacciones físicas en la estructura del gel.

Hasta el momento se han identificado cinco formas isoméricas de di-AF en geles de arabinosilanos (5-5', 8-5' benzo, 8-O-4', 8-5' y 8-8') (Figura 3). Las formas 8-5' y 8-O-4' son generalmente más abundantes en geles de arabinosilanos de trigo (Figuroa-Espinoza y Rouau, 1998; Schooneveld-Bergmans et al., 1999; Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millán et al., 2005, 2006). En cambio, en geles de arabinosilanos de maíz el di-AF 5-5' se ha reportado como mayoritario (Carvajal-Millán et al., 2007; Niño-Medina et al., 2009; Berlanga-Reyes et al., 2009). Hasta el momento se ha reportado la formación de un solo trímero de ácido ferúlico (tri-AF) (ácido 4-O-8', 5'-5''-dehidrotriferúlico) en geles de arabinosilanos de trigo y de maíz (Carvajal-Millan et al., 2005, 2007) inducidos por una lacasa.

La forma isomérica del di-AF puede tener un efecto en la elasticidad del gel de arabinosilanos, ya que no todos son efectivos en generar entrecruzamientos entre cadenas distintas del polisacárido. Según Hatfield et al. (1999), el isómero 5-5' es el único que puede formarse tanto entre cadenas distintas (intercadena) como en una misma cadena de polisacárido (intracadena). Este último tipo de unión no contribuye a la elasticidad del gel. En la formación del tri-AF en los geles de arabinosilanos, la proporción que determina la elasticidad

del gel aún no está bien definida. En general, más de 90% del contenido inicial de ácido ferúlico presente en los arabinosilanos es oxidado al formarse el gel y sólo 30% se recupera en formas de di y tri-AF conocidas hasta el momento. Algunos autores señalan la formación de estructuras de di y tri-AF distintas a las que han sido identificadas, o bien de oligómeros superiores de ácido ferúlico (tetrámeros, pentámeros) (Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005, 2006, 2007).

Bunzel et al. (2005; 2006) aislaron e identificaron dos nuevos trímeros de ácido ferúlico (ácido 8-5(no-cíclico)/5-5-dehidrotriferúlico y ácido 5-5-dehidrotriferúlico) y, por primera vez en pericarpio de maíz, dos tetrámeros de ácido ferúlico (ácido 4-O-8/5-5/8-O-4-dehidrotetraferúlico y ácido 4-O-8/5-5/8-5(no-cíclico)-dehidrotetraferúlico). Estas nuevas estructuras no han sido aún estudiadas en geles de arabinosilanos, pero dado que en la naturaleza su función es unir estos polisacáridos para dar soporte estructural a la pared celular, es muy probable que se formen durante el proceso de gelificación del polisacárido. Además de la participación de las estructuras di-AF y tri-AF anteriormente mencionados, algunos autores han señalado la contribución de interacciones físicas entre las regiones lineales de las cadenas de arabinosilanos en el establecimiento de la estructura tridimensional del gel (Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millan et al., 2005).

La presencia de cadenas laterales de xilosa se ha detectado en arabinosilanos de trigos europeos (Adams et al., 2003), las cuales pueden afectar el acercamiento de las cadenas de arabinosilanos y el establecimiento de la estructura del gel. La estructura del gel de arabinosilanos estaría entonces determinada tanto por los enlaces covalentes de ácido ferúlico (di, tri-AF), como por las interacciones físicas entre las regiones lineales de xilosa, lo cual a su vez puede afectar los parámetros estructurales y las propiedades funcionales del gel formado.

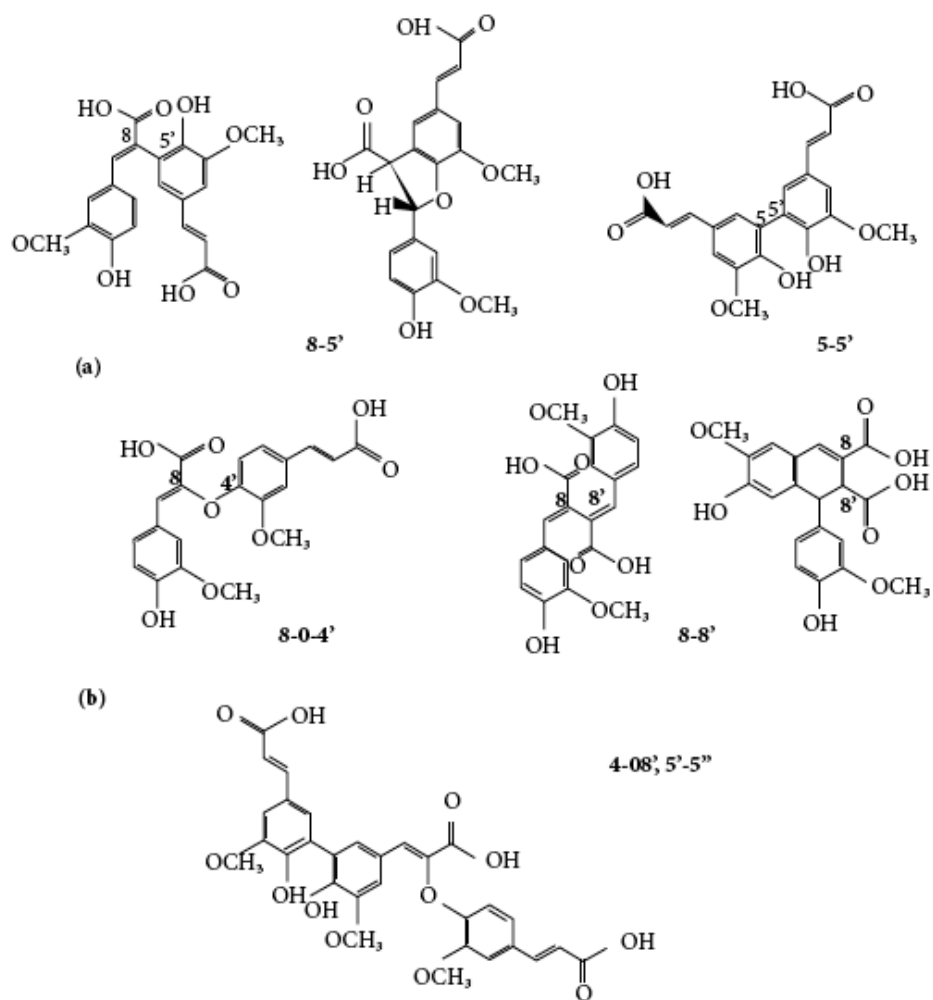


Figura 3. Estructura química de los dímeros (a) y trímeros (b) del ácido ferúlico, identificados en geles de arabinosilanos. Adaptado de Niño-Medina *et al.* (2009).

La estructura meso y macroporosa de los geles de arabinosilanos con un tamaño de poro entre 40 y 400 nm (Tabla 1) confiere a los arabinosilanos un alto potencial de aplicación en la encapsulación y transporte de biomoléculas como proteínas o péptidos terapéuticos, los cuales al suministrarse por vía oral son susceptibles a degradación enzimática durante su paso por el tracto gastrointestinal (Vansteenkiste et al., 2004; Carvajal-Millán et al., 2005).

Las biomoléculas modelo, hasta el momento estudiadas en geles de arabinosilanos, son la seroalbúmina de bovino (BSA), la ovoalbúmina y la insulina, entre otras (Carvajal-Millán et al., 2005; Berlanga-Reyes et al., 2009). Estos estudios se han realizado en geles a 1 y 2% de arabinosilanos que contienen de 0.1 a 10% de la proteína modelo encapsulada. Este amplio rango de carga de proteína en el gel permitiría una amplia gama de aplicaciones potenciales para este sistema de transporte. Una de estas aplicaciones potenciales sería la liberación controlada de insulina dirigida al colon (Berlanga-Reyes et al., 2009; Carvajal-Millán et al., 2013).

Anteriormente se había reportado una relación directa entre los parámetros estructurales del gel de arabinosilanos (tamaño de poro, densidad de puntos de unión, distancia entre dos puntos de unión) y sus propiedades funcionales (capacidad de retención de agua al equilibrio y capacidad para liberar biomoléculas de manera controlada) (Carvajal-Millán et al., 2005). Pero hasta el momento no ha sido posible cuantificar la contribución relativa de los enlaces covalentes y de las interacciones físicas en la formación del gel de arabinosilanos.



**Tabla 1. Parámetros estructurales de geles de arabinosilanos inducidos por la enzima lacasa**

Enzima comercial (0.04U/mg AX)	Fuente	AX <sup>†</sup> (% p/v)	di-AF <sup>**</sup> (µg/mg)	tri-AF <sup>‡</sup> (µg/mg)	ξ <sup>**</sup> (nm)	Mc <sup>§</sup> x 10 <sup>3</sup> (g/mol)	ρ <sub>c</sub> <sup>¶</sup> x 10 <sup>6</sup> (mol/cm <sup>3</sup> )
<i>T. versicolor</i>	Maíz	2.5	0.029	0.014	80	31	49
<i>T. versicolor</i>	Maíz	3.5	0.030	0.020	48	20	75
<i>P. cinnabarinus</i>	Trigo	2.0	0.029	0.013	305	145	12

<sup>†</sup>AX = arabinosilanos; <sup>\*\*</sup>di-AF = dímeros de ácido ferúlico; <sup>‡</sup>tri-AF = trímeros de ácido ferúlico; <sup>\*\*</sup>ξ = tamaño de poro; <sup>§</sup>Mc = peso molecular entre dos puntos de unión; <sup>¶</sup>ρ<sub>c</sub> = densidad de entrecruzamiento; <sup>§</sup>Adaptado de Berlanga-Reyes *et al.* (2009a) y Carvajal-Millán *et al.* (2005a).

## **3.2 Extracción de Arabinosilanos**

### **3.2.1 Arabinosilanos solubles en agua**

El enfoque más común para aislar arabinosilanos de varios materiales de plantas incluye medio acuoso o una extracción alcalina de estos polímeros incluso de todo el grano o de un tejido específico de la planta. Una vez aislado de la matriz de la pared celular, los arabinosilanos son solubles en agua, sin embargo, en la pared intacta, estos polímeros tienen un entrecruzamiento con otros constituyentes de las paredes para formar tejidos estructurales que no son solubles en medio acuoso. Algunos de los entrecruzados son no covalentes y mientras son individualmente débiles ellos deben conferir fuerza e insolubilidad si son presentados en gran cantidad. Las cadenas de arabinosilanos también pueden ser entrecruzadas covalentemente a cada una o a otros constituyentes de la pared celular. Como una consecuencia de estos entrecruzamientos, una cierta porción de los arabinosilanos no puede ser fácilmente extraída de los materiales de plantas con agua y requieren tratamientos más duros con soluciones alcalinas para liberarlos de la red covalente y no covalente. Algunos métodos y procedimientos para obtener arabinosilanos solubles altamente puros de cereales comunes para propósitos analíticos han sido publicados. Las extracciones son usualmente conducidas en agua o en buffers. Después de la extracción, los procedimientos de purificación usualmente involucran inactivación de enzimas endógenas en extractos acuosos y el uso de enzimas hidrolíticas para eliminar proteínas contaminadas y almidón de las preparaciones. Crowe y Rasper (1998) e Izydorczyk et al. (1991) obtuvieron extractos de pentosas casi libres de proteínas de la harina de trigo después de la adsorción de las proteínas contaminadas en los extractos de agua.

### **3.2.2 Arabinosilanos insolubles en agua**

Existen algunos reportes de investigación recientes sobre la extracción y purificación de arabinosilanos provenientes de residuos agroalimentarios. La pasta residual de la industria cervecera y de la industria azucarera, la mazorca y cascarilla de maíz, el salvado de trigo, las cáscaras de plátano, entre otros, constituyen subproductos abundantes y de bajo valor de la industria alimenticia. Estos materiales son fuentes potenciales de arabinosilanos porque son

ricos polisacáridos estructurales sin celulosa, y siendo los arabinosilanos uno de los principales componentes.

### **3.3 Arabinosilanos de Residuos Agroindustriales**

La mayoría de estudios sobre los arabinosilanos de cereales han sido desarrollados por grupos de investigación europeos que han utilizado como fuente principal a variedades de trigo, cebada y centeno (Figueroa-Espinoza y Rouau 1998; Schooneveld-Bergmans et al., 2003, 2005). Otras investigaciones se han enfocado a los subproductos que se generan por el procesamiento de cereales (Carvajal-Millán et al. 2007; Niño-Medina et al., 2009). Estos subproductos contienen principalmente arabinosilanos ferulados, por lo que la extracción de este polisacárido permitiría dar un uso alternativo a estos subproductos, ya que este polisacárido podría ser utilizado como texturizante, emulsificante o agente de encapsulación, entre otros usos.

#### **3.3.1 Residuos de la molienda de trigo**

La industria productora de harina de trigo genera diariamente grandes cantidades de pericarpio como subproducto, el cual es utilizado como alimento para ganado con un precio de mercado sumamente bajo. El pericarpio de trigo contiene polisacáridos no almidonados, principalmente arabinosilanos ferulados, por lo que la extracción de este polisacárido permitiría dar un uso alternativo a este subproducto. Dado que a nivel internacional las fuentes comerciales de arabinosilanos ferulados son escasas, la extracción de arabinosilanos ferulados a partir de pericarpio de trigo, podría tener un impacto socio-económico importante en nuestro país. Existen reportes previos sobre las características físico-químicas y funcionales de los arabinosilanos ferulados extraídos de pericarpio de trigo (Rattan et al., 1994; Izydorczyk y Biliaderis, 1995). La industria productora de harina de trigo, tales como Molino la Fama y Molino El Globo, obtiene pericarpio de trigo (15750 ton por empresa) como subproducto (Niño-Medina et al., 2010).

#### **3.3.2 Residuos de la nixtamalización del maíz**

En México, la industria productora de harina de maíz nixtamalizado, tales como Maseca y Minsa, genera anualmente grandes cantidades de pericarpio de maíz (20000 a 46000 t por empresa) y “nejayote” (3 a 6.9 millones de litros por empresa).

La nixtamalización del maíz es importante en México ya que representa la mitad del volumen total del maíz consumido en México. La nixtamalización consiste en cocinar el grano de maíz en una solución con cal; después de remojar de 2-8 horas, el sobrenadante (llamado nejayote) es descartado. El material sobrante es el consiguiente para poder obtener el nixtamal (la masa), usado para preparar una gran variedad de productos, siendo la tortilla la más popular (Billeb de Sinibaldi y Brezan, 2001). El proceso de nixtamalización degrada y solubiliza los componentes de la pared celular del maíz, y de esta forma se facilita remover el pericarpio. Como algo general, el nejayote contiene más del 60% de polisacáridos libres de almidón (Arámbula-Villa et al., 2001). Polisacáridos de la pared celular alkali-soluble sin celulosa, presentes en el pericarpio de maíz (principalmente arabinosilanos), muestran interesantes propiedades funcionales como espesantes, estabilizantes, emulsificantes y películas y formadores de gel. Debido al hecho de que el nejayote obtenido a partir de nixtamalización es un agua residual altamente alcalina, con una gran demanda química y biológica de oxígeno, es considerado un contaminante ambiental. Una típica nixtamalización de maíz, procesa 50 kg de maíz diarios, utiliza cerca de 75 litros de agua por día y genera casi la cantidad equivalente de agua residual alcalina sobre una base diaria. Por lo tanto se necesitan alternativas para la utilización de residuos de nejayote en México.

### **3.3.3 Residuos de la producción de bioetanol a partir de maíz (Dried Distiller Grain, DDG)**

El aumento en la demanda de bioetanol como un aditivo para el combustible, ha dado lugar a un aumento dramático en la cantidad de maíz utilizado para este fin (Shapouri et al., 2002). El maíz puede ser convertido en etanol por procesos molienda húmeda o molienda seca (Singh et al., 2001). La molienda húmeda requiere un amplio equipo y un alto capital de inversión; grandes volúmenes de etanol son producidos, y hay una variedad de co-productos para sufragar los costos de producción. Por otro lado, las plantas por molienda seca son más pequeñas que las de molienda húmeda, y requieren menos equipos por lo tanto ocupan una inversión menor (Singh et al., 2001). Las plantas de molienda seca producen dos coproductos mayoritarios: Etanol y DDGS (granos secos destilados); el mercadeo del DDGS es crítico para la sustentabilidad de las plantas de molienda seca. Los factores que afectan la calidad de los DDGS causan un impacto económico directo en la producción de etanol (Singh et al., 2001). La

composición de los DDGS puede variar substancialmente (Belyea et al., 1989); esto reduce la calidad de los DDGS e impacta negativamente el valor de mercado.

La proteína es el nutriente más caro en la dieta de los animales; las variaciones en la proporción de proteína en el alimento puede causar una mala formulación y puede afectar la productividad del animal. La proteína contenida en los DDGS puede variar de 27% a 35% en peso (Belyea et al., 1989). Si un productor quiere formular dietas basadas en la concentración de proteína promedio (31%) de DDGS, las dietas resultantes también pueden contener insuficiente cantidad de proteína, lo que probablemente reduzca la productividad del animal, o un exceso de proteína, que es innecesario y caro. La fuente de variación en la composición de los DDGS no está bien documentada.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Materia Prima**

La materia prima a utilizar en el presente trabajo es conocida como DDG (Dried Distiller Grain). El DDG es un subproducto directo de la producción de bioetanol a partir del maíz. El DDG fue proporcionado por una empresa comercializadora de alimento para ganado en la Ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

### **4.2 Extracción de Arabinosilanos**

Para extraer los arabinosilanos ferulados se desarrolló un método a partir del procedimiento reportado previamente por el Grupo de Biopolímeros de CIAD (Carvajal-Millán et al., 2007). Se utilizaron distintos tiempos de hidrólisis alcalina (30, 60, 120, 180 y 240 min.).

### **4.3 Caracterización de los Arabinosilanos**

#### **4.3.1 Contenido de azúcares neutros**

El contenido de azúcares neutros se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), de acuerdo a Carvajal-Millán et al. (2007). La muestra de arabinosilanos se sometió a una hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético 4N a 120°C durante 2 h utilizando manitol como estándar interno. La reacción fue detenida con hielo y los extractos fueron evaporados a 50°C, y enjuagados por duplicado con 200 µL de agua. El extracto evaporado fue solubilizado en 1 mL de agua. La muestra se filtró a través de un filtro Whatman de 0.45 µm. Se utilizó un HPLC Waters e2695 Separation Module con una columna CH Pb (7.8 x 300mm) eluída de manera isocrática con agua a 0.4 mL/min a 70°C. Se utilizó un detector de índice de refracción Waters 2414.

#### **4.3.2 Contenido de ácido ferúlico**

La cuantificación de ácido ferúlico se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR), de acuerdo a Vansteenkiste et al. (2004). El ácido ferúlico se extrajo mediante saponificación controlada. A 100 mg de muestra se agregaron 10 mL de NaOH 2N y se mantuvo en agitación durante 2 horas. Después se acidificó con 5 mL de éter y se centrifugó (1000g/20°C/5 min). Se recuperó la fase superior (éter) y se colocó en otro tubo protegido de la luz. Se agregó nuevamente éter y se repitió el procedimiento. El éter fue evaporado a 35°C bajo un flujo de argón. Una vez secos los tubos, se les agregó 1 mL de mezcla agua-metanol-ácido acético (60:30:10, v/v) y se filtró a través de un filtro Whatman de 0.45 µm. Se utilizó un HPLC Waters e2695 Separation Module. Los extractos se inyectaron en una columna C18 (250 x 4.6mm) utilizando un detector UV a 320 nm y una elución isocrática. Se utilizó un detector Waters 2998 Photodiode.

#### **4.3.3 Proteína**

El contenido de proteína en las muestras de DDG a distintos tiempos de hidrólisis se llevó a cabo por el método Dumas usando un analizador de nitrógeno Leco-FP 528 (AOAC. Official Method of Analysis of AOAC, 1995).

#### **4.3.4 Distribución de peso molecular**

La distribución de tamaño molecular de los arabinoxilanos extraídos se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Carvajal Millan et al., 2005). Los arabinoxilanos se solubilizaron en agua a una concentración de 0.5% (p/v) y se inyectaron en una columna G5000 PWXL (30cm x 7.8mm) Ultrahydrogel (Waters e2695) utilizando LiNO<sub>3</sub> 1N como eluyente en forma isocrática a un flujo de 0.6 mL/min. Se utilizó un detector de índice de refracción a 38°C.

#### **4.3.5 Gelificación**

Se prepararon soluciones de arabinoxilano de maíz al 2% (p/v) en una solución reguladora citrato-fosfato 0.5M a pH 5. Se utilizaron 2 unidades de enzima por mg de AX, de acuerdo a lo reportado anteriormente por Carvajal-Millán et al. (2005).

#### **4.3.6 Reología**

La cinética de formación del gel de arabinoxilanos fue estudiada mediante un reómetro Discovery HR de TA Instruments utilizando una geometría plana (Vansteenkiste, 2004). Los módulos elástico ( $G'$ ) y viscoso ( $G''$ ) se midieron a 25°C por 1 hora. Se utilizó una frecuencia 0.25 Hz y un porcentaje de deformación del 5%. Se llevó a cabo un barrido de frecuencia a 5% de deformación y 25°C de temperatura junto con un barrido de deformación a 0.25Hz a 25°C.

#### **4.3.7 Microscopía electrónica de barrido**

Se realizó un análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) en los geles de arabinoxilanos formados, los cuales fueron liofilizados para su análisis. Los análisis fueron hechos en el Laboratorio de Microscopía del CIAD Unidad Guaymas, en un microscopio electrónico de barrido (SEM) Karl Zeiss, Mod. EVO LS10.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 5.1 Extracción de AX

En la Figura 4 se muestra el rendimiento de extracción de los AX a cinco tiempos distintos de hidrólisis.

El rendimiento de extracción de los AX aumentó de 2.5 a 4.2% (p/p), cuando el tiempo de hidrólisis se incrementó de 15 a 120 min. A un mayor tiempo de hidrólisis (180 min) el rendimiento de extracción de AX disminuyó a 4.0% (p/p), presentando un comportamiento similar al reportado por Carvajal-Millan et al. (2007).

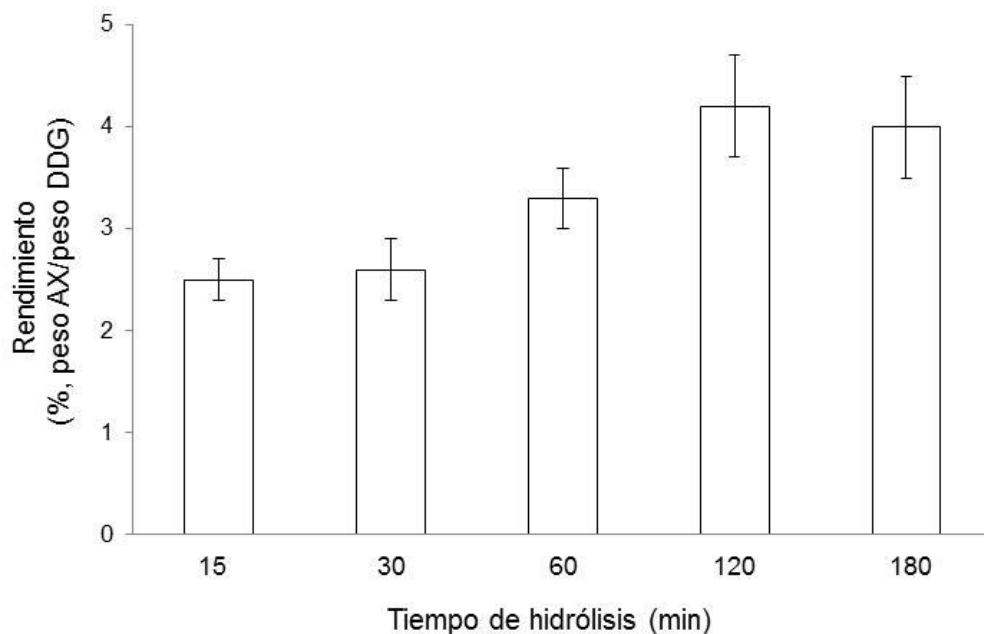


Figura 4. Rendimiento de extracción de AX a partir de DDG utilizando distintos tiempos de hidrólisis alcalina.

## 5.2 Caracterización Composicional

### 5.2.1 Contenido de azúcares neutros

La composición de azúcares neutros de los AX se muestra en la Tabla 2. Los AX presentaron una composición mayoritaria de arabinosa y xilosa. Este valor fue estimado de la suma de arabinosa + xilosa. La proporción de arabinosa-xilosa (A/X) varió de 1.21 a 0.73, indicando una estructura de alta a moderadamente ramificada. Resultados similares han sido reportados en arabinoxilanos de pericarpio de maíz (Carvajal-Millan et al., 2007). Residuos de glucosa y galactosa fueron también detectados en los AX obtenidos.

**Tabla 2. Composición de azúcares en los AX obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis**

Tiempo de hidrólisis (min)	Glucosa	Xilosa	Arabinosa	A+X	A/X
15	4.06 ± 0.01	17.26 ± 0.11	20.94 ± 0.01	38.21 ± 0.12	1.21
30	3.63 ± 0.09	26.34 ± 0.35	23.47 ± 0.13	49.81 ± 0.48	0.89
60	3.23 ± 0.09	26.92 ± 1.33	23.32 ± 0.67	50.24 ± 0.65	0.86
120	3.11 ± 0.11	31.83 ± 0.76	25.39 ± 0.20	57.23 ± 0.96	0.79
180	2.76 ± 0.11	32.31 ± 2.30	23.83 ± 0.67	56.15 ± 2.97	0.73

Azúcares en g/100g

Todos los resultados fueron obtenidos por duplicados

### 5.2.2 Contenido de ácido ferúlico

El contenido de ácido ferúlico (AF) de los AX obtenidos varió de 6.14 a 0.02  $\mu\text{g}/\text{mg}$  AX. Los valores de 0.48 a 0.02  $\mu\text{g}/\text{mg}$  AX son similares a los obtenidos por otros autores utilizando otros subproductos de maíz como son el nejayote y el pericarpio nixtamalizado (Niño-Medina et al., 2009 Carvajal-Millan et al., 2007). Sin embargo, el valor de 6.14  $\mu\text{g}/\text{mg}$  AX es superior a lo reportado hasta el momento en AX recuperados de los subproductos de maíz reportados como fuentes de AX (nejayote y el pericarpio nixtamalizado), lo cual puede deberse al hecho de que dichos subproductos han sido anteriormente expuestos a la hidrólisis alcalina que implica la nixtamalización, la cual afecta el contenido de AF en los AX.

**Tabla 3. Contenido de ácido ferúlico obtenidos en los AX a distintos tiempos de hidrólisis**

Tiempo de hidrólisis (min)	Contenido de ácido ferúlico
15	6.14 $\pm$ 0.15
30	0.48 $\pm$ 0.20
60	0.06 $\pm$ 0.04
120	0.06 $\pm$ 0.02
180	0.02 $\pm$ 0.01

Ácido ferúlico en  $\mu\text{g}/\text{mg}$

Resultados obtenidos por duplicados

### 5.2.3 Contenido de proteína

Los AX extraídos presentaron un contenido de proteína en el rango reportado por otros autores en AX de maíz (Carvajal-Millán et al., 2007; Lapiere et al., 2001). Previos estudios han sugerido que existe un contenido de proteína fuertemente asociada o ligada a la estructura de los AX, el cual es del 2-8% (p/p). Este puede variar dependiendo del origen de los AX y el método utilizado para su obtención (Whistler y Bemiller, 1956; Yadav et al., 20011). La asociación AX-proteína y el papel que podría desempeñar esta fracción proteica en el polisacárido ha sido tema de polémica pero aún no ha sido esclarecido.

**Tabla 4. Contenido de proteína en los AX extraídos con distintos tiempos de hidrólisis**

Tiempo de hidrólisis (min)	Proteína
15	1.31 ± 0.20
30	1.42 ± 0.31
60	8.85 ± 0.04
120	8.79 ± 0.70
180	8.61 ± 0.12

Proteína en g/100g

Resultados obtenidos por duplicado

#### 5.2.4 Distribución de peso molecular

Se determinó la distribución de peso molecular (PM) de los AX obtenidos mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una regresión lineal de tiempo contra logaritmo de peso molecular en kDa de estándares de peso molecular conocido. Se aplicó la ecuación de la regresión al pico más alto del cromatograma de cada uno de los AX obtenidos. Acorde a los resultados de la regresión lineal, los AX presentaron valores estimados entre 201 a 234 kDa (Tabla 5), los cuales están en el rango reportado para otros AX (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). No se encontró una disminución del PM de los AX al aumentar el tiempo de hidrólisis durante la extracción, lo cual indica que esta condición afecta de manera más importante el contenido de AF en la molécula, como se discutió anteriormente en la Tabla 3.

**Tabla 5. Valores de distribución de peso molecular en los AX**

Tiempo de hidrólisis (min)	Peso molecular
15	201
30	215
60	206
120	207
180	234

Peso molecular en kDa

Resultados obtenidos por duplicado

### 5.2.5 Gelificación

La formación de los geles al 2% de AX (p/v) fue estudiada mediante reología dinámica de baja deformación (Figuras 5-8). Las soluciones de AX mostraron un aumento en el módulo elástico ( $G'$ ) en función del tiempo hasta alcanzar un *pseudo plateau*. Los valores de  $G'$  fueron iguales a los del módulo viscoso ( $G''$ ) (tan delta  $G''/G'$  igual a uno) entre los 4 y 10 minutos, sin encontrar una relación entre el tiempo de hidrólisis y el tiempo de cruce de dichos módulos. Este valor es considerado el tiempo de gelificación ( $t_g$ ) y es menor al reportado en AX de trigo al 2% (w/v), en los cuales el  $t_g$  varía entre 20 y 25 minutos (Carvajal-Millan *et al.*, 2005). Lo anterior podría ser explicado en base al menor peso molecular de los AX de maíz utilizados en este estudio (201-234 kDa) respecto a los AX de trigo (400-600 kDa). Este mayor peso molecular en los AX de trigo forma soluciones de AX más viscosas retardando la acción de la lacasa, lo que se ve reflejado en una fase inicial de poco incremento en  $G'$ , lo cual no se observa en los AX de maíz utilizados en el presente estudio. Los valores de  $G'$  al final del experimento disminuyeron de 1000 a 30 Pa conforme el tiempo de hidrólisis con que fueron extraídos los AX aumentó de 15 a 180 minutos (Figura 6). Lo anterior puede estar relacionado con el contenido de AF en los distintos AX obtenidos ya que el valor de  $G'$  final de los geles formados disminuyó al reducirse el contenido de AF en la molécula.

Los espectros mecánicos de los geles después de 1 hora a 25°C se muestran en la Figura 7. Estos espectros son típicos de geles con los valores de  $G'$  lineales e independientes de la frecuencia de deformación y los valores de  $G''$  mucho más pequeños y dependientes de la frecuencia (Doublier y Cuvelier, 1996). Este comportamiento es similar al reportado anteriormente para AX gelificados con lacasa o el sistema peroxidasa/ $H_2O_2$  (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Dervilly-Pinel *et al.*, 2001; Vansteenkiste *et al.*, 2004; Carvajal-Millan *et al.*, 2005). El aumento en tan delta al incrementarse el tiempo de hidrólisis con que fueron extraídos los AX indica una mayor contribución viscosa a la estructura del gel (Doublier y Cuvelier, 1996).

Los barridos de amplitud de los geles después de 1 hora a 25°C se muestran en la Figura 8. El barrido de amplitud sirve para poder observar que tan resistente a la deformación es el gel formado. Como se muestra en la Figura 8, todos los geles de AX al 2% resisten porcentajes de deformación de 0 al 20% manteniendo valores constantes de  $G'$  y  $G''$ . Estos barridos muestran que al 5% de deformación, valor seleccionado para realizar las mediciones reológicas en este estudio, los geles presentan valores de  $G'$  y  $G''$  lineales.

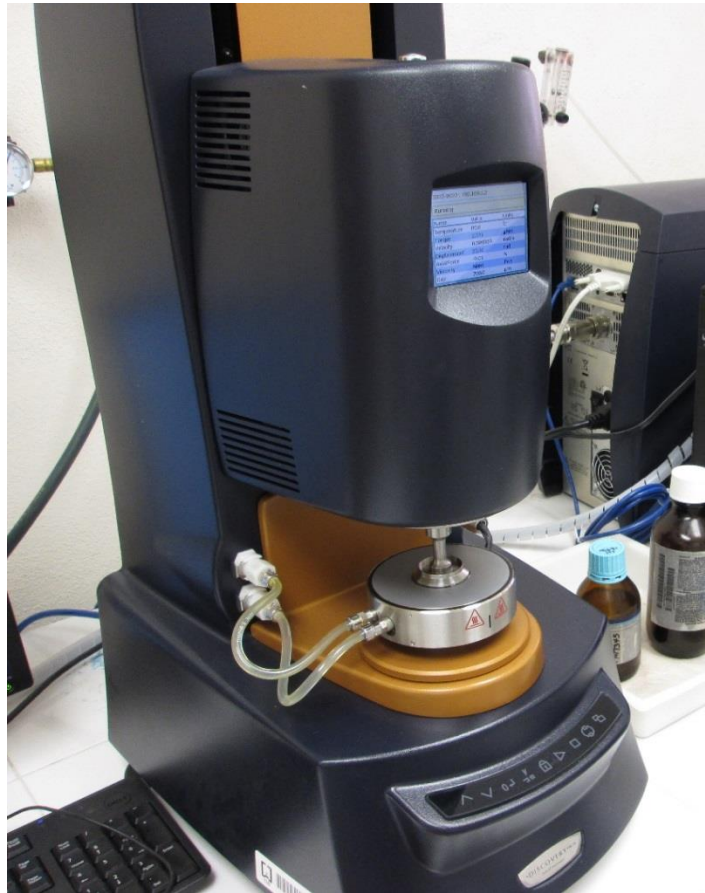


Figura 5. Análisis reológico del gel de arabinosilano

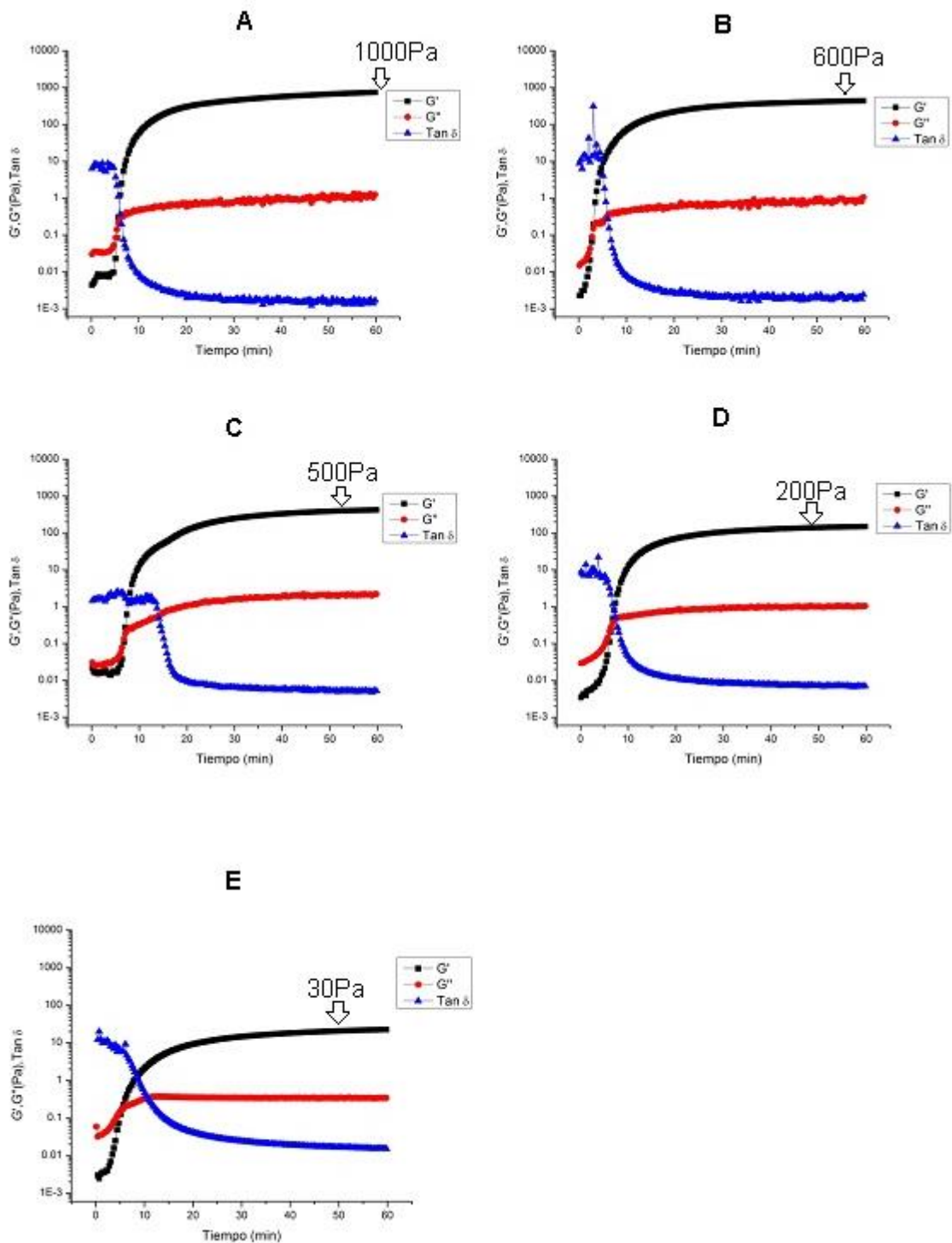


Figura 6. Cinéticas de gelificación de soluciones de arabinosilanos de DDG al 2% (p/v) a distintos tiempos de hidrólisis (A=15min, B=30min, C=60min, D=120min y E=180min). Gelificación inducida por una lacasa a 25°C, 0.25 Hz y 5% de deformación. Resultados obtenidos por duplicado.



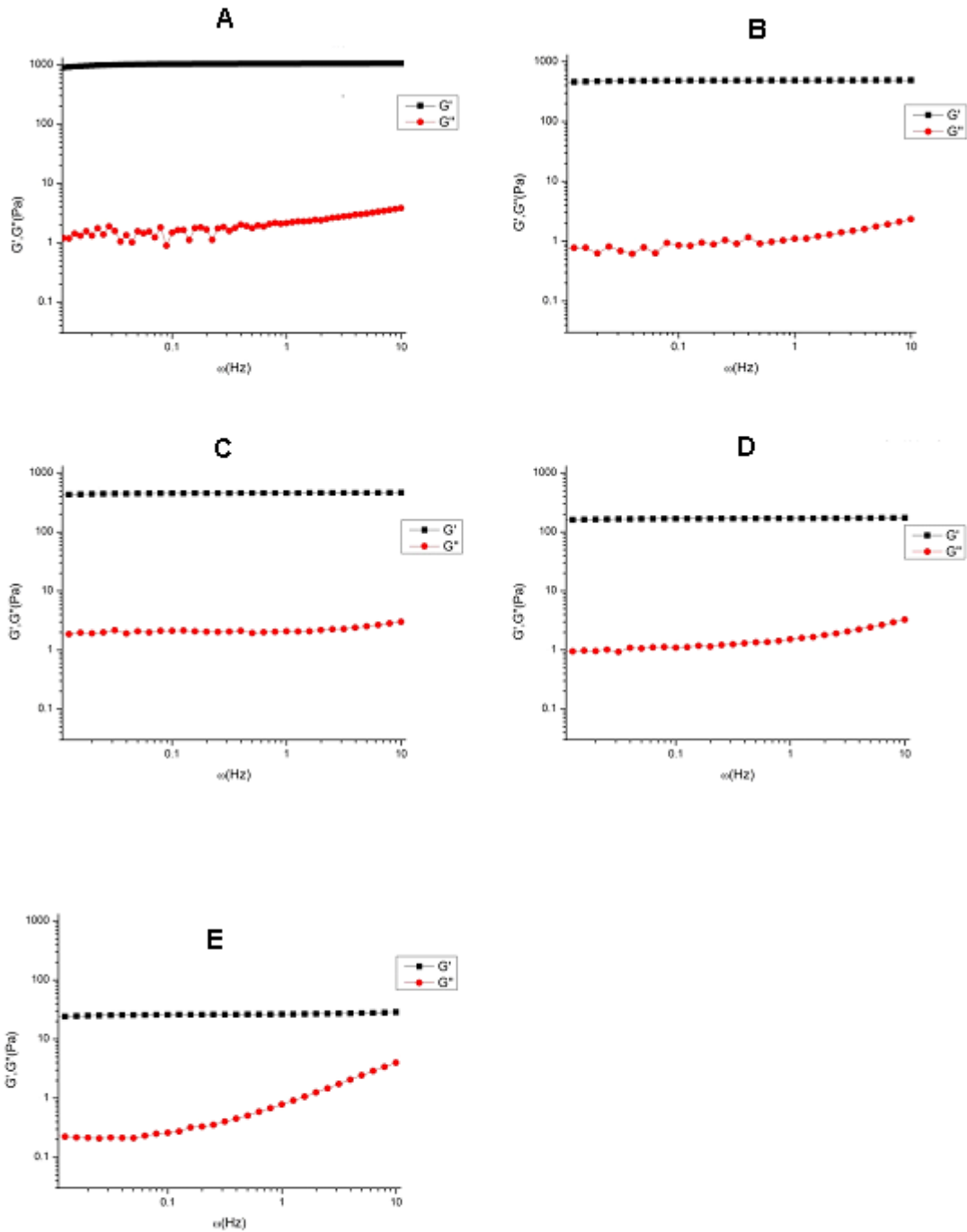


Figura 7. Barrido de frecuencia de geles de arabinosilanos de DDG al 2% (p/v) obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis (A=15min, B=30min, C=60min, D=120min y E=180min). Geles con una hora de formación. Análisis a 25°C y 5% de deformación. Resultados obtenidos por duplicado.

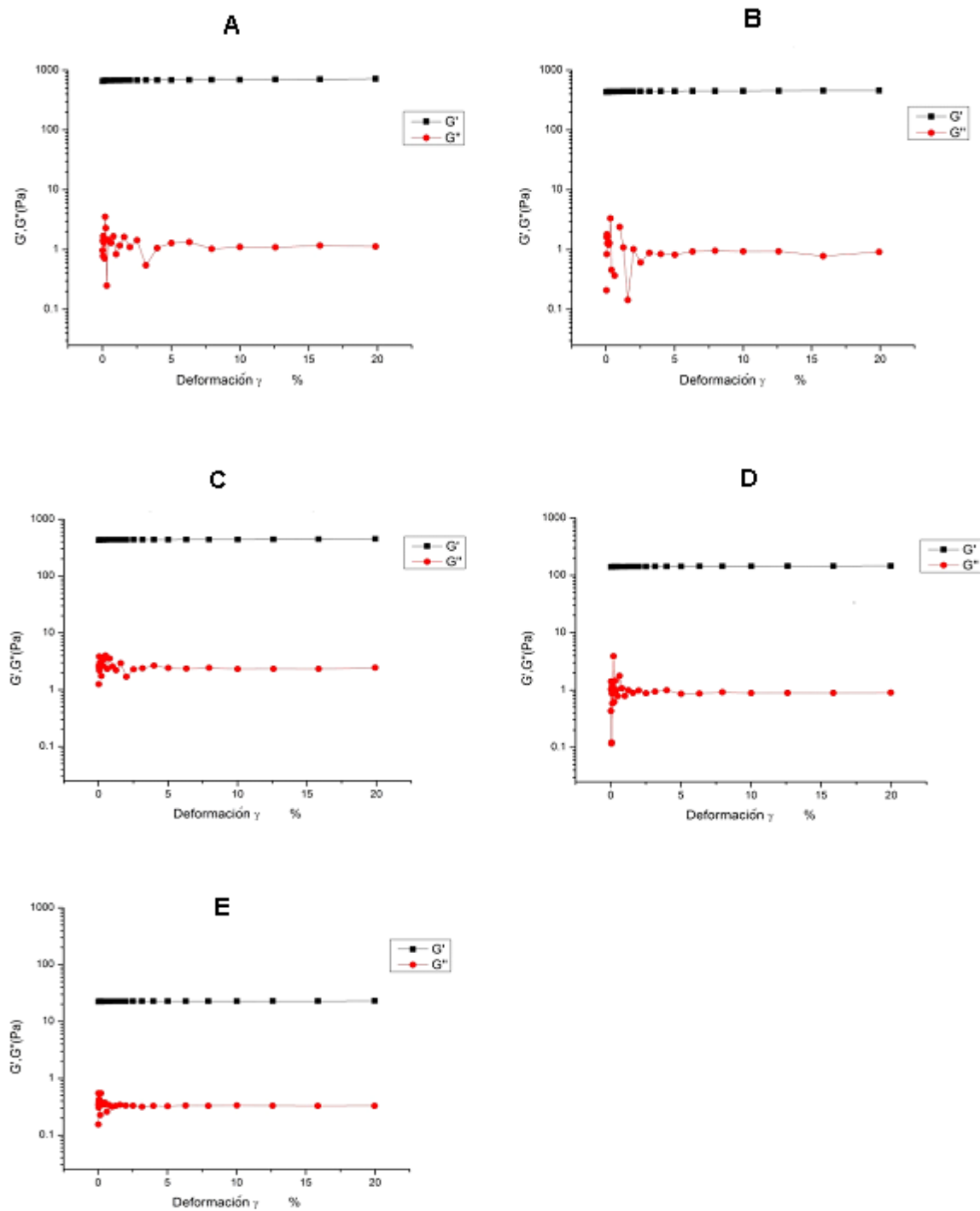


Figura 8. Barridos de amplitud de geles de arabinosilanos al 2% (p/v) obtenidos a distintos tiempos de hidrólisis (A=15min, B=30min, C=60min, D=120min y E=180min). Geles con una hora de formación. Análisis a 25°C y 0.25 Hz de frecuencia. Resultados obtenidos por duplicado.

### 5.2.7 Microscopía electrónica de barrido

La microestructura de los geles de los distintos AX obtenidos en el presente estudio fue analizada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las imágenes se muestran en las Figuras 9-13. En las imágenes SEM de los geles de AX se puede observar una estructura porosa heterogénea de tipo panal de abeja imperfecto, lo cual concuerda con previos reportes en geles de AX (Martínez-López et al., 2013; Morales-Ortega et al., 2013, 2014). Para el análisis SEM los geles de AX fueron liofilizados. Los procesos de formación de hielo y de sublimación que implica la liofilización son determinantes en la morfología del material y, en consecuencia, es diversamente afectada por las condiciones de congelación y otros fenómenos térmicos que ocurren durante el procedimiento de secado. Las Figuras 9-13 muestran las imágenes de los geles liofilizados de AX obtenidos en esta investigación. Las magnificaciones empleadas son de 200x, 300x, 600x y 1000x. Es posible ver que en el gel de AX de 15 min de tiempo de hidrólisis presenta una estructura con porosidades más pequeñas y continuas y que conforme aumenta el tiempo de hidrólisis con que fueron extraídos los AX se obtiene un gel menos estructurado y con porosidades de mayor tamaño. Estas diferencias son concordantes con los resultados encontrados en el análisis reológico de los geles de AX donde la  $G'$  disminuyó de 1000 a 30 Pa al aumentar el tiempo de hidrólisis con que el polisacárido fue extraído y, a su vez, este resultado concuerda con la pérdida de AF al aumentar dicho tiempo.

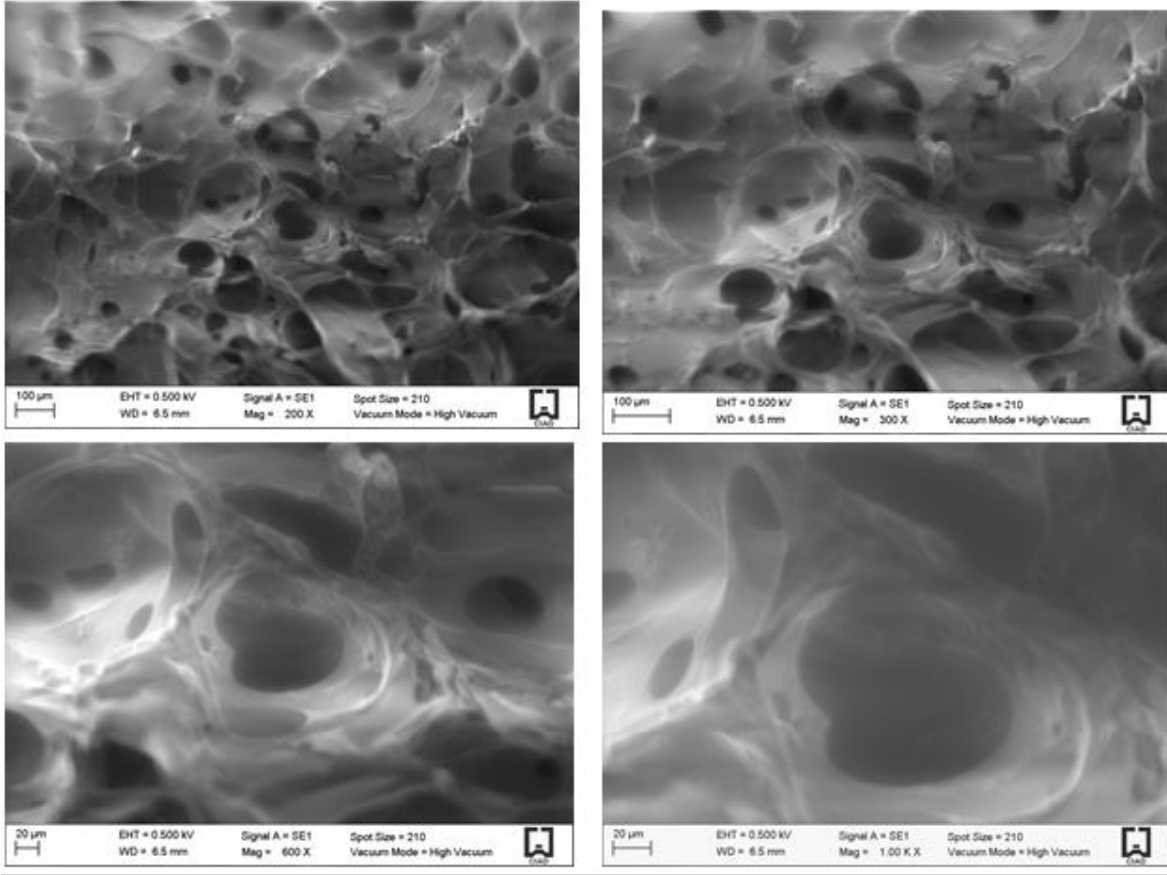


Figura 9. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 15 min de hidrólisis

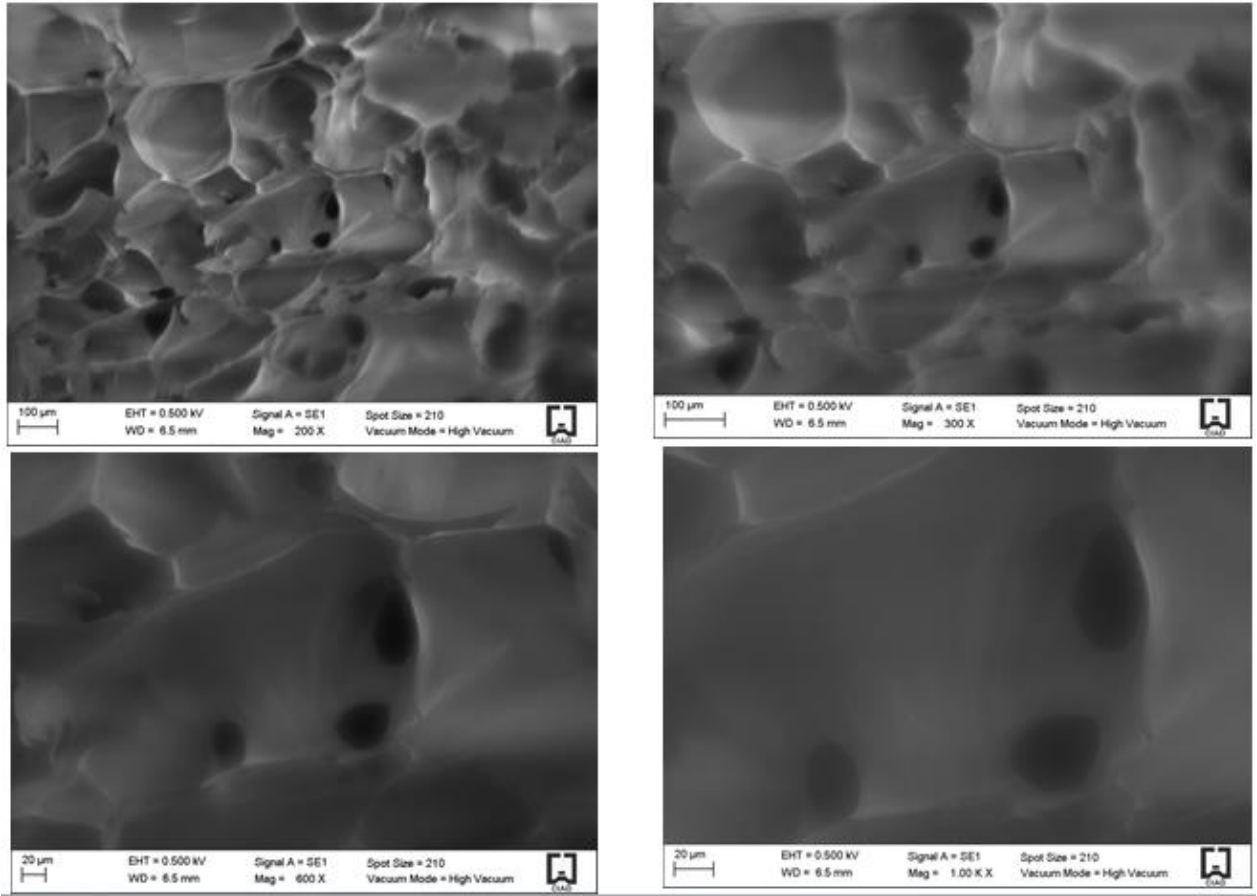


Figura 10. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 30 min de hidrólisis

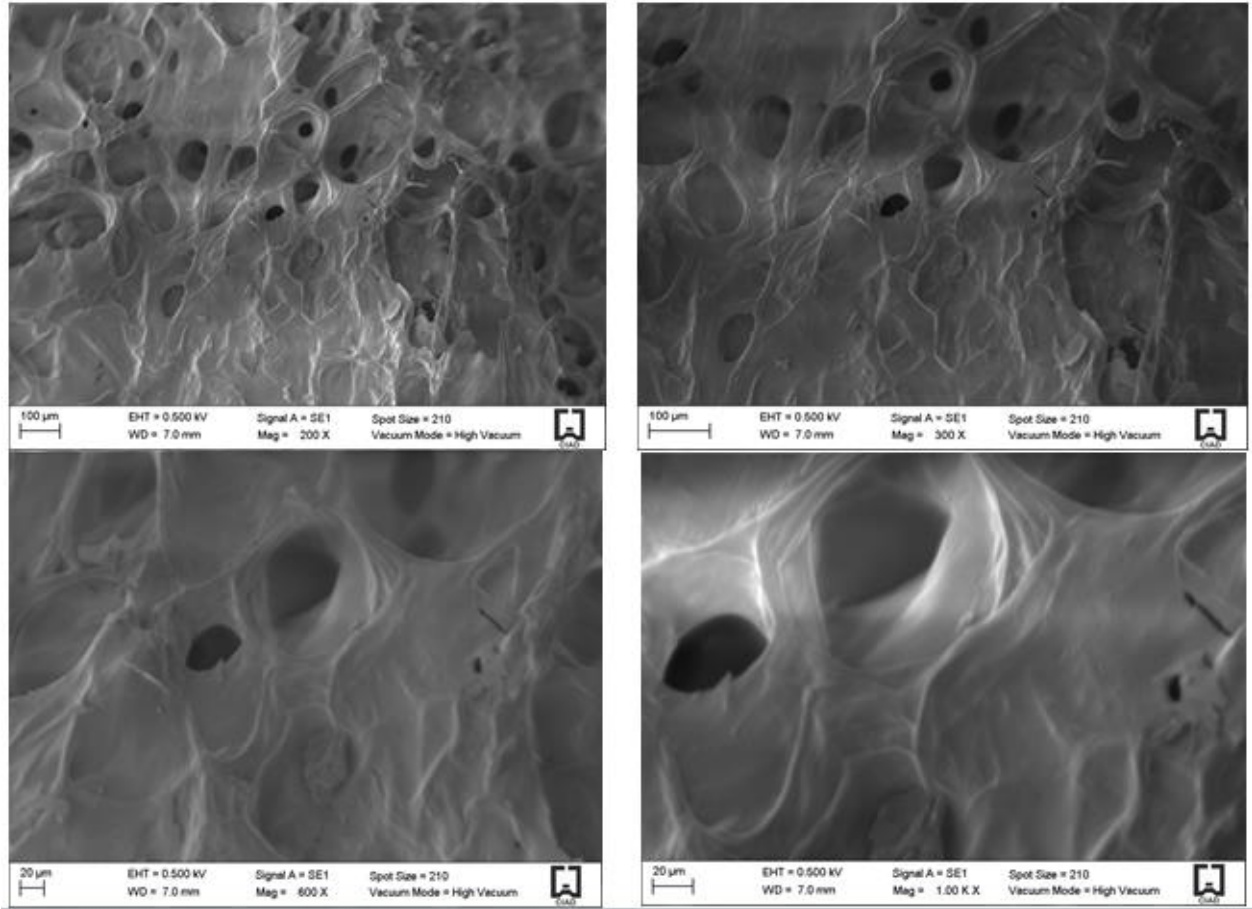


Figura 11. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 60 min de hidrólisis

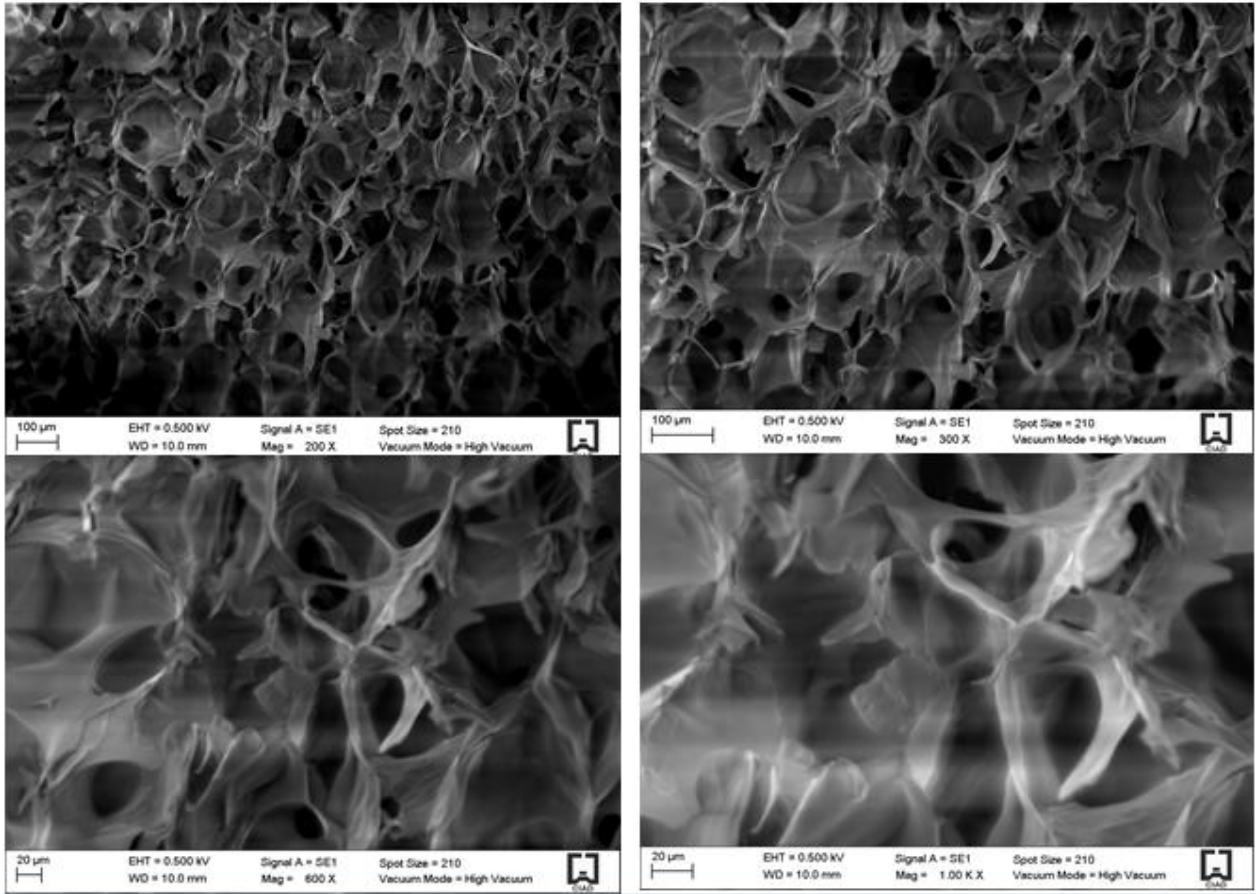


Figura 12. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 120 min de hidrólisis

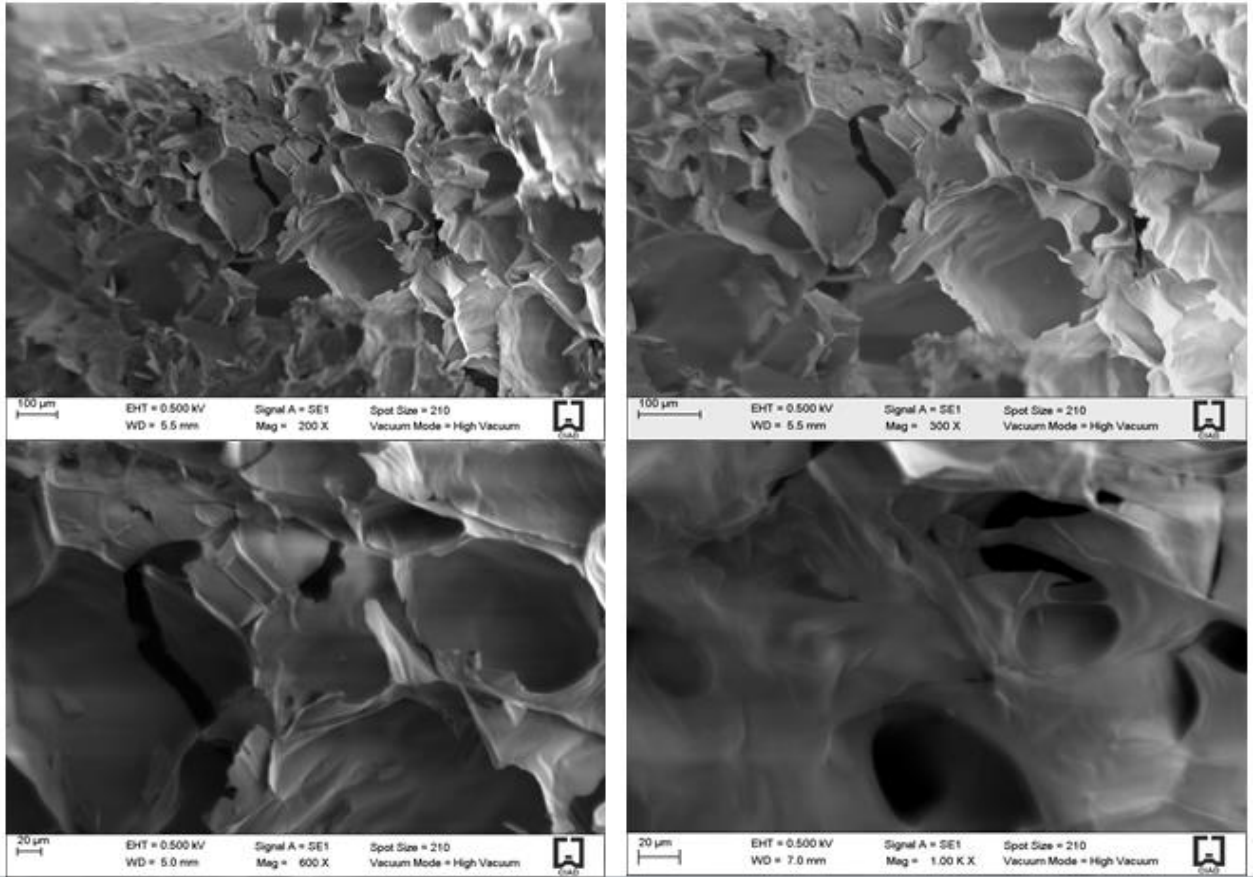


Figura 13. Gel AX 2% (p/v). AX obtenidos con 180 min de hidrólisis



## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el rendimiento de extracción de AX a partir de DDG varía dependiendo del tiempo de hidrólisis alcalina utilizado. Los valores del rendimiento aumentaron de 2.5 a 4.2 (% peso AX/peso DDG) al incrementar el tiempo de hidrólisis de 15 a 120 minutos, mientras que a mayores períodos de hidrólisis (180 y 240 minutos) el rendimiento disminuyó hasta un valor de 3.6 (% peso AX/peso DDG). Esos valores son mayores a los reportados al utilizar otras fuentes de este polisacárido, por ejemplo, la harina de trigo (0.5% peso AX/peso harina).

Se encontró que al aumentar el tiempo de hidrólisis utilizado el grado de sustitución (A/X) y el contenido de AF de los AX extraídos disminuye de 1.21 a 0.73 y de 6.14 a 0.02  $\mu\text{g}$  AF/mg AX, respectivamente, lo cual está relacionado con la hidrólisis de las uniones glucosídicas xilosa-arabinosa y las uniones éster arabinosa-ácido ferúlico en la molécula de polisacárido. Los valores de A/X encontrados indican que se obtuvieron AX altamente ramificados (A/X=1.21) a moderadamente ramificados (A/X= 0.73). El valor más alto de AF encontrado en el presente estudio (6.14  $\mu\text{g}$  AF/mg AX), al tiempo de hidrólisis de 15 minutos, posiciona a esos AX en un nivel superior al reportado en la literatura para AX de diversas fuentes.

Debido a la presencia de AF en los AX extraídos, estos polisacáridos presentan capacidad gelificante. Los geles covalentes de AX formados presentan valores de elasticidad ( $G'$ ) que disminuyen de 1000 a 30 Pa conforme el tiempo de hidrólisis con que la molécula fue extraída aumentó de 15 a 180 minutos. Lo anterior está directamente relacionado con la disminución en el contenido de AF en dichas muestras.

Los análisis reológicos (barridos de frecuencia y amplitud) realizados en los geles de AX indican que a pesar de las diferencias en los polisacáridos, derivadas de los tiempos de hidrólisis con que se obtuvieron, todos los materiales presentan características viscoelásticas típicas de un gel con los valores de  $G'$  lineales e independientes de la frecuencia de deformación y los valores de viscosidad ( $G''$ ) mucho más pequeños y dependientes de la frecuencia. Los valores de tan delta ( $G''/G'$ ) de los geles de AX fueron bajos, indicando la presencia de un sistema elástico. El aumento en el valor de tan delta de los geles de AX

conforme el tiempo de hidrólisis de extracción de la molécula aumentó indica una mayor contribución viscosa a la estructura del gel.

La morfología de los geles de AX obtenidos analizada mediante microscopía de barrido electrónica (SEM) indica que estos materiales presentan una estructura porosa heterogénea y que la conectividad de la red polimérica disminuye al aumentar el tiempo de hidrólisis con que se extrajo el polisacárido. Lo anterior está ligado con la disminución en los valores de  $G'$  encontrados en el análisis reológico.

Los resultados de este estudio indican que es posible obtener AX con capacidad gelificante a partir de DDG. Las características reológicas y microestructurales de los geles de AX formados depende principalmente del contenido de AF en el polisacárido. Los AX extraídos con el menor tiempo de hidrólisis forman geles con alta elasticidad y conectividad microestructural mientras que los AX recuperados en el mayor tiempo de hidrólisis son menos elásticos y estructurados. De esta manera, los geles de AX elásticos y estructurados podrían tener un potencial de aplicación como sistemas encapsulantes mientras que los geles más débiles podrían ser más adecuados como texturizantes.

Dado que a nivel internacional las fuentes de AX son escasas y los precios de este polisacárido son altos, la implementación de una fuente alternativa como el DDG para la obtención de AX gelificantes podría tener un gran impacto económico positivo en nuestro país. De acuerdo a lo anteriormente expuesto se recomienda:

- Realizar más estudios al DDG para conocer aún más sus propiedades y características como fuente de biomoléculas funcionales.
- Diseñar y optimizar un proceso a mayor escala para la extracción de los AX a partir del DDG.
- Evaluar las propiedades funcionales de los AX y los geles de AX extraídos de DDG.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams LE, Kroon PA, Williamson G, Morris VJ (2003) Characterization of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy. *Carbohydrate Res.* 338:771-780.
- Andrewartha KA, Phillips DR, Stone BA (1979) Solution properties of wheat-flour arabinoxylans and enzymatically modified arabinoxylans. *Carbohydrate Res.* 77:191-204.
- AOAC (1995) Official Method of Analysis of AOAC Intl. Method 991.43, 16th ed.; Association of Official Analytical Communities: Arlington, TX, USA.
- Arámbula-Villa G, Barrón-Ávila L, González-Hernández J, Moreno-Martínez E, Luna-Bárcenas G (2001) Efecto del tiempo de cocimiento y reposo del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas, reológicas, estructurales y texturales del grano, masa y tortillas de maíz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 51, 187–194.
- Autio K (2006) Functional aspects of cereal cell-wall polysaccharides. In: *Carbohydrates in Food.* A-C Eliasson (ed). CRC-Taylor & Francis. Boca Raton, FLA. Pág: 167-207.
- Bartolo-Pérez P, JL Peña, Cruz-Orea A, Calderón A (1999) Estudio de la composición química de pericarpio de maíz con las técnicas XPS y EDAX. *Superficies y Vacío* 8, 64-68.
- Belyea RL, Steevens BJ, Restrepo RR, Clubb AP (1989) Variation in composition of by-product feeds. *J. Dairy Sci.* 72, 2339–2345.
- Berlanga-Reyes CM, Carvajal-Millán E, Juvera GC, Rascón-Chu A, Márquez- Escalante JA, Martínez-López AL (2009) Laccase induced maize bran arabinoxylan gels: Structural and rheological properties. *Food Sci. Biotech.* 18:1027-1029.
- Billeb de Sinibaldi AC, Brezan R (2001) Características de cocción por nixtamalización de once variedades de maíz. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición.* 51, 86–94.
- Bunzel M, Ralph J, Funk C, Steinhart H (2005) Structural elucidation of new ferulic acid-containing phenolic dimers and trimers isolated from maize bran. *Tetrahedron Lett.* 46:5845-5850.

- Bunzel M, Ralph J, Bruning P, Steinhart H (2006) Structural identification of dehydrotriferulic and dehydrotetraferulic acids isolated from insoluble maize bran fiber. *J. Agric. Food Chem.* 54:6409-6418.
- Calcaterra A, Galli C, Gentili P (2008) Phenolic compounds as likely natural mediators of laccase: a mechanistic assessment. *J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.* 51:118-20.
- Carvajal-Millán E, Guilbert S, Morel MH, Micard V (2005) Impact of the structure of arabinoxylan gels on their rheological and protein transport properties. *Carbohydrate Polymers.* 60: 431–438.
- Carvajal-Millan E, Guilbert S, Doublier JL, Micard V (2006) Arabinoxylan/protein gels: structural, rheological and controlled release properties. *Food Hydrocolloids.* 20:53-61.
- Carvajal-Millán E, Rascón-Chu A, Márquez- Escalante JA, Micard V, Ponce de León N, Gardea A (2007) Maize bran gum: extraction, characterization and functional properties. *Carbohydrate Polymers.* 69:280-285.
- Crowe NL, Rasper VF (1998) The ability of chlorine and chlorine-related oxidants to induce oxidative gelation in wheat flour pentosans. *J. Cereal Sci.* 7, 283–294.
- Dervilly G, Saulnier L, Roger P, Thibault JF (2000) Isolation of homogeneous fractions of wheat water-soluble arabinoxylan. Influence of structure on their macromolecular characteristics. *J. Agric.Food Chem.* 48:270-278.
- Dervilly-Pinel G, Thibault JF, Saulnier L (2001) Experimental evidence for a semi-flexible conformation for arabinoxylans. *Carbohydr. Res.* 330:365-72.
- Figueroa-Espinoza MC, Rouau X (1998) Oxidative crosslinking of pentosans by a fungal laccase and horseradish peroxidase: Mechanism of linkage between feruloylates arabinoxylans. *Cereal Chem.* 75:259-265.
- Grootaert C, Delcour JA, Courtin CM, Broekaert WF, Verstraete W, Van de Wiele T (2007) Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends Food Sci. Technol.* 18:64-71.
- Halliwell B (1978) Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta* 140:81-88.

- Hatfield RD, Ralph J, Grabber J H (1999) Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.* 79:403–407.
- Ishii T (1997) Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Sci.* 127:111-127.
- Izydorczyk MS, Biliaderis CG, Bushuk W (1991) Comparison of structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat varieties. *Cereal Chem.* 68, 139,
- Izydorczyk MS, Biliaderis CG (1995). Cereal arabinoxylan: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 28:33-48.
- Izydorczyk MS, Biliaderis CG (2007). Arabinoxylans: Technologically and nutritionally functional plant polysaccharides. En: Functional Food Carbohydrates. CG Biliaderis, MS Izydorczyk (eds). CRC Press, Boca Raton. FL, USA. Pág: 249-290.
- Lapierre C, Pollet B, Ralet MC, Saulnier L (2001) The phenolic fraction of maize bran: Evidence for lignin-heteroxylan association. *Phytochemistry* 57:765-772.
- Lorenz KJ, Kulp K, Dekker M (1991) Handbook of Cereal Science and Technology, Inc. New York.
- Matz SA (1991) The chemistry and technology of cereals as food and feed (2<sup>nd</sup>. Edition). The Avi Publishing Company. Pag. 86
- Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Lizardi J, Rascon-Chu A, Marquez-Escalante JA, Gardea A, Martinez-Lopez AL, Guerrero V (2009) Maize processing waste water arabinoxylans: gelling capability and cross-linking content. *Food Chemistry* 115: 1286-1290.
- Niño-Medina G, Carvajal-Millán E, Rascon-Chu A, Márquez-Escalante JA, Guerrero V, Salas-Muñoz E (2010) Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: Structure, sources and applications. *Phytochemistry Reviews.* 9:111-120.
- Papon P, Leblond J, Meijer P (2006) Gelation and transitions in biopolymers. En: The Physics in Phase Transition. Concepts and Applications. 2nd ed. Springer-Verlag. New York. Pág: 189-213.
- Rattan O, Izydorczyk MS, Biliaderis CG (1994) Structure and rheological behavior of arabinoxylans from Canadian bread wheat flours. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 27:550-555.

- Saulnier L, Thibault JF (1999) Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar.beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.* 79:396-402.
- Saulnier L, Sado PE, Branlard G, Charmet G, Guilon F (2007) Wheat arabinoxylan: exploiting variation in amount and composition to develop enhanced varieties. *J. Cereal Chem.* 46:261-281
- Selinheimo E, Autio K, Kruus K, Buchert J (2007) Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. *J. Agric. Food Chem.* 55:6357-6365.
- Schooneveld-Bergmans MEF, Dignum MJW, Grabber JH, Beldman G, Voragen AGJ (1999) Studies on oxidative cross-linking of feruloylated arabinoxylans from wheat flour and wheat bran. *Carbohydr. Polym.* 38:309-317.
- Shapouri H, Duffield JA, Wang M (2002) The energy balance of corn ethanol: An update. *Agric. Econ. Rept.* 813. USDA/OCE, Washington, DC.
- Shyama PRR, Muralikrishna G (2007) Structural characteristics of water-soluble feruloyl arabinoxylans from rice (*Oryza sativa*) and ragi (*Finger millet, Eleusine coracana*): variations upon malting. *Food Chem.* 104:1160-1170.
- Singh VJ, Rausch KD, Yang P, Shapouri H, Belyea RL, Tumbleson ME (2001) Modified Dry Grind Ethanol Process. Public. No. 2001-7021. Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL.
- Smith MM, Hartley RD (1983) Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr. Res.* 118:65-80.
- Sternemalm E, Höije A, Gatenholm P (2008) Effect of arabinose substitution on the material properties of arabinoxylan films. *Carbohydr. Res.* 343:753-757.
- Vansteenkiste E, Babot C, Roau X, Micard V (2004) Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids.* 18: 557-564.
- Vinks CJA, Delcour JA (1996) Rye (*Secale cereal* L.) arabinoxylan. A critical review. *J. Cereal Sci.* 24:1-14.
- Wolf MJ, Buzan C., MacMasters MM, Rist CE (1952) *Cereal Chem.* 29, 321.