

2016

Producción de arabinosidos de pericarpio de maíz mediante el uso de solventes, cavitación hidrodinámica y tratamiento enzimático.

Oscar Yael Barrón García



Universidad Autónoma de
Querétaro

Producción de arabinosidos de pericarpio de maíz
mediante el uso de solventes, cavitación hidrodinámica y
tratamiento enzimático.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado
de

Maestro en

INGENIERÍA DE CALIDAD Y PRODUCTIVIDAD

Presenta

Oscar Yael Barrón García



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería de Calidad y Productividad

PRODUCCIÓN DE ARABINOXILANOS DE PERICARPIO-DE MAÍZ, MEDIANTE EL
USO DE SOLVENTES, CAVITACIÓN HIDRODINÁMICA Y TRATAMIENTO ENZIMÁTICO.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestría en Ingeniería de Calidad y Productividad

Presenta:

Ing. Oscar Yael Barrón García

Dirigido por:

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel

SINODALES

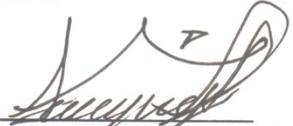
Dra. Marcela Gaytán Martínez
Presidente

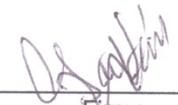
Dr. Juan Carlos Contreras Esquivel
Secretario

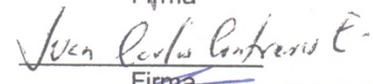
M.I. Eric Leonardo Huerta Manzanilla
Vocal

M.I. Javier García Pérez
Suplente

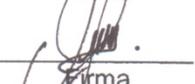
M.C. Francisco Rafael Pérez Muñoz
Suplente


Dr. Aurelio Domínguez González
Director de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y
Posgrado

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

Octubre 2016

México

RESUMEN

El maíz es un cereal fundamental en la alimentación de los mexicanos, en el 2011 se consumieron alrededor de 26 896 miles de toneladas, por lo que es el primer producto agropecuario. Lo que da como resultado una gran cantidad de subproductos o residuos, que son un problema de contaminación. Uno de estos residuos es el pericarpio de maíz. Dentro de la composición química del pericarpio se tienen arabinosilanos, compuesto valioso y de alto costo. Por lo que puedes extraerse estos compuestos dando un valor agregado al pericarpio y a su vez eliminar un problema ecológico. Se usó un pretratamiento de lavado para la extracción de proteínas residuales (principalmente zeínas) del pericarpio de maíz. Las condiciones que dieron mayor extracción fueron: 800 mg de pericarpio de maíz, con tres lavados usando 20 ml de propilenglicol/agua (1:1), con agitación constante. La cuantificación de zeína extraída se determinó a través de una curva de calibración, utilizando un estándar de zeína hidrolizada con una endoproteasa y analizada por el método de genipina. Para liberar los arabinosilanos fue necesario usar hidrólisis enzimática. En esta hidrólisis, la hemicelulasa con actividad ferúlico esterasa y xilanasas carentes de actividad ferúlico esterasa fueron las que se usaron. La hemicelulasa fue la que dio mayor rendimiento (~30% mayor usando propilenglicol/agua). Debido a que las enzimas son caras se usó la hemicelulasa combinada con cavitación para evaluar si existe una mayor recuperación de arabinosilanos. El efecto de la cavitación hidrodinámica se evaluó mediante diseños factoriales, los tiempos de operación seleccionados fueron 15 y 60 minutos, ambos favorecieron la extracción de proteína debido al aumento de la temperatura, 58°C y 116°C respectivamente. La liberación de azúcares totales se analizó por el método ácido sulfúrico-orcinol. Los resultados mostraron un mayor efecto con la cavitación hidrodinámica a los 15 minutos combinada con la hemicelulasa, esto se demostró a través de los resultados de azúcares reductores. La cavitación hidrodinámica combinada con el tratamiento enzimático favoreció la liberación de los arabinosilanos de pericarpio de maíz, aunque son necesarios más análisis para conocer detalladamente la estructura de estos compuestos.

(Palabras clave: arabinosilanos, pericarpio de maíz, hemicelulasa, cavitación hidrodinámica, zeína)

SUMMARY

Maize is a major food cereal in Mexican nutrition. In 2011, about 26 986 thousand tons were consumed making it the first agricultural product. The production of this product results in extensive subproducts and waste, which is a pollution problem. One of these residues is the corn pericarp. The pericarp is chemical composed of arabinoxylans, which is a valuable and expensive compound. In order to eliminate an ecological problem, these compounds can be removed giving a benefit to the pericarp. A washing pretreatment is used for the extraction of residual proteins of corn pericarp (mainly zein). The conditions that gave greater extraction were: 800 mg of corn pericarp, with three washings using 20 ml of propyleneglycol/water (1:1), with constant stirring. Zein extracted quantification was determined through a calibration curve using a standard zein hydrolyzate with an endoproteasa and analyzed by the method of genipin. To release the arabinoxylans, it was necessary to use enzymatic hydrolysis. In this hydrolysis process, ferulic esterase hemicellulase and xylanase without ferulic esterase activity were used. Hemicelullase gave the highest yield (~30% higher using propyleneglycol/water). Because enzymes are expensive, hemicellulase was combined with cavitation to improve the recovery of arabinoxylans. The effect of hydrodynamic cavitation was evaluated by factorial designs for the selected operation times of 15 and 60 minutes; both protein extraction favored due to temperature increase, 58°C and 116°C respectively. The release of total sugars was analyzed by orcinol-sulfuric acid method. Results showed a greater effect with hemicelullase combined within 15 minutes of hydrodynamic cavitation, demonstrated by the results of reducing sugars. Hydrodynamic cavitation combined with enzymatic treatment favored the release of arabinoxylans from corn pericarp, although analysis for detailed structure of these compounds are required.

(Keywords: arabinoxylans, corn pericarp, hemicelullase, hydrodinamic cavitation, zein)

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ingeniería y a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila.

A la empresa Coyotefoods Biopolymer and Biotechnology S. de R. L. MI.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

INDICE

RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE ECUACIONES	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.2. Pared Celular	6
2.2.1. Celulosa	6
2.2.2. Hemicelulosa	8
2.3. Pectinas	13
2.4. Enzimas	17
2.4.1. Xilanasas	17
2.3.2. Esterasas	18
2.3.3. Celulasas	18
2.3.4. Pectinasas	20
2.4. Condiciones que afectan la actividad enzimática	23
2.5. Cavitación Hidrodinámica	24
2.6. Objetivos, pregunta de investigación e hipótesis	25
2.7.1. Hipótesis	25
2.7.2. Objetivo	26
2.7.3. Objetivos específicos	26
3. METODOLOGÍA	26

3.1.	Condiciones del Experimento	26
3.1.1.	Lugar donde se realizó el estudio	26
3.1.1.	Materia Prima	26
3.2.	Equipo	27
3.3.	Material	28
3.4.	Reactivos	29
3.4.1.	Enzimas	30
3.5.	Método	31
3.5.1.	Selección de la enzima	31
3.6.2.	Análisis bromatológico	34
3.6.3.	Pretratamiento del pericarpio de maíz con propilenglicol	36
3.6.4.	Ensayos enzimáticos del pericarpio de maíz	37
3.6.5.	Cavitación hidrodinámica	38
3.6.6.	Efecto de la cavitación hidrodinámica en la liberación de proteína con respecto al número de lavados	38
3.6.7.	Tratamiento enzimático del pericarpio de maíz después de la cavitación hidrodinámica	39
4.	RESULTADOS	39
4.1.	Análisis bromatológico del pericarpio de maíz	39
4.2.	Pretratamiento del pericarpio de maíz con propilenglicol	40
4.2.1.	Efecto del porcentaje de propilenglicol	40
4.2.2.	Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz	43
4.2.3.	Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado	45
4.2.4.	Efecto del tiempo de lavado del pericarpio de maíz	47
4.2.5.	Efecto del número de lavados del pericarpio de maíz	48
4.2.6.	Cuantificación de zeína	51
4.3.	Selección de la enzima	54
4.3.1.	Xilanasas de <i>Thermomyces lanuginosus</i>	54
4.3.2.	Cuantificación de proteína	55
4.3.3.	Detección de la actividad ferúlico esterasa	56
4.3.4.	Análisis de la actividad enzimática de diferentes extractos enzimáticos	57

4.3.5.	Hidrólisis química de arabinoxilanos de trigo	58
4.3.6.	Hidrólisis enzimática de arabinoxilanos de trigo	59
4.3.7.	Hidrólisis enzimática del pericarpio de maíz	60
4.3.8.	Ensayos enzimáticos del pericarpio de maíz	61
4.3.	Cavitación hidrodinámica	63
4.4.1.	Efecto de la cavitación hidrodinámica en la liberación de proteína con respecto al número de lavados	64
4.4.2.	Tratamiento enzimático del pericarpio de maíz después de la cavitación hidrodinámica	66
4.4.3.	Determinación de los azúcares totales	66
4.4.4.	Azúcares reductores	68
5.	CONCLUSIONES	69
6.	APÉNDICE	70
6.1.	Impacto ambiental del proceso	70
6.2.	Abreviaturas	71

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Proporción de las partes anatómicas del maíz (%) (FAO, 1993).</i>	5
<i>Tabla 2. Características de las xilanasas de diferentes microorganismos (Beg et al., 2001).</i>	24
<i>Tabla 3. Análisis bromatológico del pericarpio de maíz.</i>	40
<i>Tabla 4. ANOVA del efecto del porcentaje de propilenglicol en relación a la proteína extraída.</i>	41
<i>Tabla 5. ANOVA del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz.</i>	43
<i>Tabla 6. ANOVA del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado.</i>	46
<i>Tabla 7. ANOVA del efecto del número de lavados del pericarpio de maíz en relación a la cantidad de proteína extraída.</i>	49
<i>Tabla 8. Cuantificación de zeína extraída con propilenglicol/agua con respecto al número de lavados.</i>	53
<i>Tabla 9. ANOVA de la cantidad de zeína extraída con respecto al número de lavados con propilenglicol/agua.</i>	53
<i>Tabla 10. Caracterización de las actividades enzimáticas de la xilanasasa (<i>T. lanuginosus</i>).</i>	55
<i>Tabla 11. Análisis de las actividades enzimáticas.</i>	57
<i>Tabla 12. Cuantificación de zeína extraída por cavitación hidrodinámica y propilenglicol/agua con respecto al número de lavados.</i>	65
<i>Tabla 13. ANOVA de la cantidad de zeína extraída por cavitación hidrodinámica y propilenglicol/agua con respecto al número de lavados.</i>	65
<i>Tabla 14. ANOVA del efecto del tratamiento enzimático con relación a los azúcares totales liberados.</i>	67
<i>Tabla 15. ANOVA del efecto del tratamiento enzimático con relación a los azúcares reductores liberados.</i>	69

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura del xilano y los sitios de ataque por las enzimas xilanolíticas.</i>	2
<i>Figura 2. Unidad repetida de Celobiosa.</i>	6
<i>Figura 3. Pared celular de Arabidopsis thaliana.</i>	8
<i>Figura 4. Composición de la pared celular de las plantas. Formada principalmente de celulosa, hemicelulosa y pectina unidas con lignina, un polímero fenólico. La lignina forma una matriz donde los polisacáridos están embebidos, esta estructura entre cruzada dificulta la degradación enzimática lo que les confiere protección a las plantas (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011).</i>	9
<i>Figura 5. Elementos estructurales del AX: A) residuo de β-D-xilopiranosil, B) y D) residuo de D-xilopiranosil sustituido con residuos de L-arabinoxilano, C) unión del ácido ferúlico al residuo de L-arabinofuranosil (Izydorczyk y Dexter, 2008).</i>	12
<i>Figura 6. Estructura esquemática de la pectina mostrando los polisacáridos pécticos: homogalacturonano (HG), xilogalacturonano (XGA), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) unidos entre ellos (Caffall y Mohnen, 2009).</i>	14
<i>Figura 7. Representación esquemática de la estructura primaria de las pectinas (Pérez et al., 2003).</i>	16
<i>Figura 8. Pericarpio de maíz troceado Zean Bran C75.</i>	27
<i>Figura 9. Estructura del grano de maíz (Micklos, 2015).</i>	27
<i>Figura 10. Efecto del porcentaje de propilenglicol en relación a la proteína extraída.</i>	41
<i>Figura 11. Intervalos de confianza al 95% para el efecto del porcentaje de propilenglicol en relación a la proteína extraída.</i>	42
<i>Figura 12. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación a la proteína extraída.</i>	43
<i>Figura 13. Intervalos de confianza al 95% del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz.</i>	44
<i>Figura 14. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado.</i>	45
<i>Figura 15. Intervalos de confianza al 95% del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado.</i>	46
<i>Figura 16. Efecto del tiempo de lavado del pericarpio de maíz en relación con la proteína extraída.</i>	47
<i>Figura 17. Intervalos de confianza al 95% del efecto del tiempo en la cantidad de proteína extraída.</i>	48
<i>Figura 18. Efecto del número de lavados del pericarpio de maíz en relación a la cantidad de proteína extraída.</i>	49
<i>Figura 19. Intervalos de confianza al 95% del efecto del número de lavados del pericarpio de maíz en relación a la cantidad de proteína extraída.</i>	50
<i>Figura 20. Hidrólisis de la zeína por acción de la endo-proteasa. A) Zeína disuelta en propilenglicol/agua/buffer de boratos. B) Zeína disuelta en propilenglicol/agua/buffer de boratos hidrolizada por acción de la endo-proteasa.</i>	51

<i>Figura 21. Cuantificación de zeína por el método de genipina. A) Zeína hidrolizada con la endo-proteasa. B) Control en ausencia de zeína. C) Zeína sin hidrolizar.</i>	52
<i>Figura 22. Curva de calibración de zeína.</i>	52
<i>Figura 23. Intervalos de confianza al 95% de la cantidad de zeína extraída con respecto al número de lavados con propilenglicol/agua.</i>	54
<i>Figura 24. Curva de calibración de proteína.</i>	56
<i>Figura 25. Detección de la actividad ferúlico esterasa.</i>	57
<i>Figura 26. Cromatograma de la hidrólisis química a diferentes tiempos de los arabinoxilanos de harina trigo.</i>	59
<i>Figura 27. Cromatograma de la hidrólisis enzimática de los arabinoxilanos de harina trigo.</i>	60
<i>Figura 28. Cromatograma de la hidrólisis enzimática del pericarpio de maíz.</i>	61
<i>Figura 29. Azúcares reductores liberados por el tratamiento enzimático del pericarpio de maíz con diferentes tratamientos de lavado.</i>	62
<i>Figura 30. Aumento de la temperatura durante los procesos de cavitación hidrodinámica. (A) Cavitación Hidrodinámica durante 15 min. (B) Cavitación hidrodinámica durante 60 min.</i>	63
<i>Figura 31. Efecto de la cavitación hidrodinámica en la liberación de proteína con respecto al número de lavados.</i>	64
<i>Figura 32. Cuantificación de los azúcares totales liberados por los diferentes tratamientos.</i>	67
<i>Figura 33. Cuantificación de los azúcares reductores liberados por los diferentes tratamientos.</i>	68

INDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1. Regresión lineal obtenida de la curva de calibración de zeína.</i>	53
<i>Ecuación 2. Regresión lineal para la curva de calibración de proteína.</i>	56
<i>Ecuación 3. Regresión lineal del aumento de la temperatura con respecto al tiempo del proceso de cavitación hidrodinámica.</i>	63

1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país, el maíz es un cereal fundamental en la alimentación de los Mexicanos, y es el cultivo de mayor presencia, constituye un insumo para la ganadería y para la obtención de numerosos productos industriales, por lo que, desde el punto de vista alimentario, económico, político y social, es el cultivo agrícola más importante (Galindo et al., 2012).

Este cereal es el primer producto agropecuario consumido con alrededor de 26 896 miles de toneladas para el 2011 (INEGI, 2012). Debido a lo anterior da como resultado una serie muy amplia de subproductos o residuos, que son un problema de contaminación. La cantidad anual de residuos oscila alrededor de 45 millones de toneladas de materia seca (maíz, sorgo, trigo, frijol, arroz, cebada, soya, algodón, cártamo y ajonjolí), de las cuales 25.5 millones de toneladas corresponden al rastrojo y olote de maíz (González Muñoz, 2010).

Estos residuos agroindustriales, puede ser utilizados de distintas maneras para generar productos con un alto valor agregado y eliminar un problema ecológico. Aunque como podemos observar en la Fig. 1 se requiere de una gran variedad de enzimas hidrológicas para la degradación completa del xilano.

Los residuos del maíz, presentan dentro de su composición una alta concentración de xilanos, es por esto, que son de gran interés para su utilización como materia prima en la producción de arabinoxilanos (AXs) con capacidad antioxidante. Esta capacidad, se debe a que 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 AXs ferulados (Smith y Hartley, 1983).

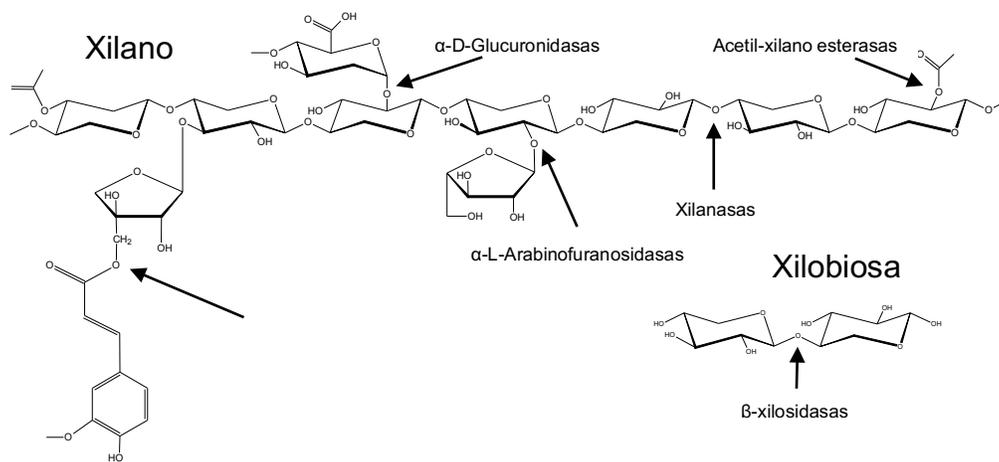


Figura 1. Estructura del xilano y los sitios de ataque por las enzimas xilanolíticas.

Estos polisacáridos se han reportado principalmente en el trigo (*Triticum aestivum* L.), centeno (*Secale cereale* L. M. Bieb.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), avena (*A. Sativa*), arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo (*Sorghum vulgare*), maíz (*Zea mays* L.) y mijo (*Panicum miliaceum* L.) (Morales-Ortega et al., 2013). Los AXs están formados por una cadena principal de residuos β -D-xilopiranosil unido por enlaces β -1,4 (Roets, 2009). Se clasifican en dos grupos según sus propiedades fisicoquímicas: 20-30% de los AXs son extraíbles en agua (WE-AX), mientras los restantes 70-80% son no extraíbles con agua (WU-AX), pero una fracción de estos puede ser después solubilizada por trabajo mecánico o tratamiento enzimático (Dornez, 2007).

Los AXs son compuestos valiosos y de alto costo, por lo que el pericarpio de maíz puede ser una fuente de elección, ya que se trata de un producto de la agricultura altamente disponible y barato. El valor comercial de AXs deriva principalmente de sus aplicaciones como ingredientes alimentarios, pero han surgido nuevas perspectivas en muchos sectores industriales tales como cosméticos, productos farmacéuticos, materiales (en particular, en la formación de películas), en la química tradicional, y estudios recientes han demostrado que mejora la capacidad inmune-antitumoral (Serban, 2014).

Un segundo beneficio potencial para la salud puede ser consecuencia de los ácidos fenólicos asociados a los AXs. Se sabe que estos presentan una fuerte actividad antioxidante, ya que eliminan radicales libres y tiene actividades anti-inflamatorias (Aguedo et al., 2014).

Sin embargo, la extracción de los AXs a partir de pericarpio de maíz es difícil debido a la compleja red estructural de las paredes celulares. La pared celular es una estructura macromolecular compleja que rodea y protege a las células, por lo que es una característica distintiva de las plantas y esencial para su supervivencia.

Debido a lo anterior, varios procesos se han explorado a escala de laboratorio para la extracción de AXs de pericarpio de maíz, aunque algunos de estos procesos implican utilizar medios acuosos alcalinos, que son violentos y pueden romper algunos grupos funcionales de los AXs, como el ácido ferúlico, lo que disminuye sus propiedades funcionales. Por lo tanto, las estrategias enzimáticas para la extracción de AXs constituyen alternativas viables. Una de las enzimas que ha mostrado gran potencial son las endoxilasas (Wang et al., 2014).

Los procesos enzimáticos para la extracción de este compuesto son una alternativa, sin embargo, son procesos sumamente costosos por lo que es posible potenciar el rendimiento utilizando tecnologías emergentes o alternativas. Una de estas tecnologías, que está siendo usada en la industria de alimentos con gran éxito es la cavitación hidrodinámica (HC), que es un método físico de extracción y que se ha reportado, ayuda en la separación del almidón y las proteínas extraídas de las hemicelulosas (Carrillo Cortés et al., 2012).

La HC describe el proceso de la generación e implosión de burbujas que se producen en un líquido que fluye como resultado de la disminución y posterior aumento de la presión. Las burbujas cavitantes liberan energía en forma localizada a través de la emisión de ondas de choque. En consecuencia, el rompimiento de partículas sólidas que nos permita la extracción de los AXs.

Este estudio pretende acoplar a la extracción un procedimiento de HC que nos ayude en la separación del almidón y las proteínas extraídas de las hemicelulosas aisladas mejorando así la extracción con respecto al rendimiento y la pureza. Además, esta investigación está enfocada al diseño de un proceso de extracción por HC combinada con un tratamiento enzimático para la producción de AXs de pericarpio de maíz, utilizando un diseño experimental factorial.

2. REVISION DE LITERATURA

Este trabajo aborda el desarrollo y aplicación de un nuevo proceso para liberación de AXs a partir de pericarpio de maíz, obteniendo productos de alto valor agregado de un desecho agroindustrial. Los AXs, actualmente son distribuidos únicamente por compañías trasnacionales en nuestro país. Megazyme, originaria de Irlanda, es una de ellas, el costo de un gramo de AXs de harina de trigo insolubles con ~80% de pureza es de \$612.51 (Megazyme, 2016). En tanto que un gramo de AXs de harina de trigo de alta pureza (~95%) tiene un costo de \$1020.92 (Megazyme, 2016). Además del costo hay que considerar los tiempos de entrega y los tramites que se tiene que realizar con la compañía Megazyme para que estos productos puedan entrar a México.

Por lo que se pretende extraer AXs a partir de pericarpio de maíz, usando la combinación de un método físico y enzimático. El proyecto se realizó en la Universidad Autónoma de Querétaro en colaboración con la empresa Coyotefoods Biopolymer and Biotechnology S. de R. L. MI. (Saltillo, Coahuila).

2.1. Descripción del grano de maíz

El grano del maíz es conocido botánicamente como cariósido, una baya en la cual la cáscara de la fruta esta fusionada con la semilla, formando un solo grano. El grano está unido al olote mediante el pedicelo, por el cual a través de conductos internos, llegan los productos de la fotosíntesis al mismo, durante su desarrollo (Gaytán-Martínez, 2011). El grano o cariósido del maíz se subdivide en cuatro partes fundamentales: pericarpio, endospermo, germen y pedicelo (Fig. 9) (Saldívar, 1996).

El pericarpio es la capa externa que encierra a la semilla, representa alrededor del 5-6 % del grano y está compuesto de varias capas de células de pared gruesa, alargada y petrificada, formando un tejido denso y duro, que sirve de protección para el grano contra agentes bióticos externos, como insectos o microorganismos, además funcionan como medio de conducción y distribución del agua y nutrientes durante la germinación (Saldívar, 1996).

El endospermo es la mayor proporción del grano, alrededor del 80-85% del peso total, y cerca del 86.4% es almidón. Además contiene el 75% del total de las proteínas (principalmente zeínas) presentes en el grano, éstas son insolubles en agua lo que le confiere la dureza al endospermo, y por consiguiente muchos factores que afectan el procesamiento de alimentos (Gaytán-Martínez, 2011). Las zeínas, son las proteínas de almacenamiento del maíz, y han sido tradicionalmente extraídas con base en su solubilidad en solventes alcohólicos (Wallace et al., 1990).

La producción de zeína, oscila alrededor 500 toneladas por año a partir de la harina de gluten de maíz y se vende alrededor de los 10-40 dólares por kilogramo dependiendo de la pureza. La capacidad de la zeína para formar recubrimientos hidrófobos a prueba de grasa y su resistencia al ataque microbiano la hacen de interés comercial. Entre otras aplicaciones como adhesivos, revestimientos, tinta, cosméticos, goma de mascar o plásticos biodegradables (Shukla y Cheryan, 2001).

El germen constituye entre el 10-12% del peso seco del grano sirve como almacén de nutrientes del endospermo, carece de almidón y presenta un alto contenido de aceite, proteínas, azúcares solubles y cenizas (Saldívar, 1996). El pedicelo es el tejido por el cual se encuentra unido el grano al olote, y constituye aproximadamente el 0.5% del total del grano (Gaytán-Martínez, 2011).

En la Tabla 1, se muestran las proporciones de la composición del grano de maíz, es importante destacar que son aproximaciones ya que existen diferencias en la cantidad de nutrientes entre las distintas especies, y la variabilidad se debe a diferencias genéticas y/o ambientales (FAO, 1993). Los AXs, son los principales polisacáridos no amiláceos de los granos de cereales, aproximadamente un 60-65% se localizan en las paredes celulares (Morales-Ortega et al., 2013). Componen alrededor del 20-27% de la capa aleurona, 23-32% del pericarpio y 2-4% del endospermo (Ramseyer et al., 2011). Por lo tanto, desarrollar un proceso de extracción eficiente es primordial para la producción de AXs.

Tabla 1. Proporción de las partes anatómicas del maíz (%) (FAO, 1993).

	Pericarpio	Aleurona	Endospermo Almidonoso	Germen	Pedicelo
Maíz	5-6	2-3	80-85	10-12	0.5

2.2. Pared Celular

La pared celular está compuesta por tres tipos de polímeros incluyendo la celulosa, hemicelulosa, y lignina. La celulosa y hemicelulosa son los carbohidratos poliméricos mayormente producidos durante la fotosíntesis (Juturu y Wu, 2014).

2.2.1. Celulosa

La celulosa es el biopolímero renovable y biodegradable más abundante sobre la tierra con una cantidad aproximada de entre 1.5×10^{12} toneladas producidas por año (Huber et al., 2012). La fuente natural de celulosa mayormente explotada es la madera, aunque está presente en gran cantidad en otras plantas como el cáñamo, el lino, el yute, el ramio y el algodón (Eichhorn et al., 2010). En cereales como el arroz, el maíz y el trigo se encuentran en el pericarpio y en el germen, junto con las hemicelulosas y la lignina (Badui Dergal, 2006).

Estructuralmente, la celulosa es un polisacárido lineal formado de azúcares-aldehído, también conocidos como unidades de D-glucopiranosas unidas por enlaces glucosídicos β -1,4 (Ioelovich, 2008; Huber et al., 2012). Estas unidades de D-glucopiranosas se unen en grupos de dos por enlaces glucosídicos β -1,4 para formar las unidades de celobiosas (Huber et al., 2012), constituyen las unidades que se repiten dentro del polímero de celulosa (Eichhorn et al., 2010). En la Figura 2 se muestra la estructura de la unidad de celobiosa.

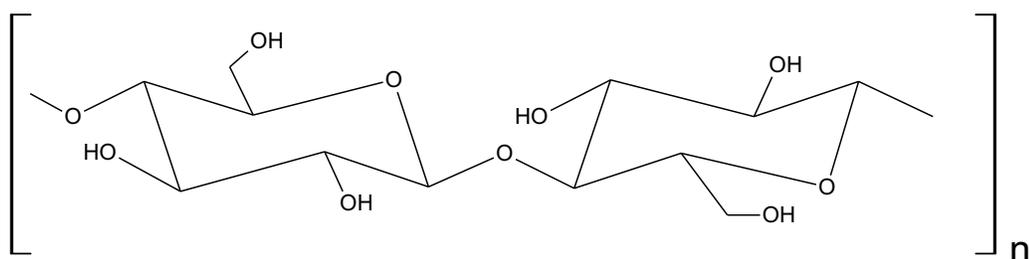


Figura 2. Unidad repetida de Celobiosa.

Este homopolisacárido presenta una alta resistencia química y mecánica debido a que las cadenas paralelas se alinean sobre un eje longitudinal, para formar una estructura cristalina de cadenas β -1,4-D-glucano mediante puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der

Waals, lo que da origen a las microfibrillas de celulosa (Badui Dergal, 2006; McFarlane et al., 2014).

Dependiendo del grado de ordenamiento de las moléculas, podemos identificar regiones altamente ordenadas (cristalinas), y regiones de bajo orden (amorfas) (Kamel et al., 2008; Huber et al., 2012). La celulosa es un material insoluble en agua y en los solventes comunes como consecuencia de estas fuertes uniones intermoleculares e intramoleculares entre las cadenas individuales (Kamel et al., 2008).

El grado de polimerización de la celulosa nativa varía dependiendo de su origen, y puede estar dentro de un rango entre 1000-30000 unidades (Ioelovich, 2008). Debido a que la celulosa es el principal polímero de soporte de la pared celular, la longitud, el ángulo y la cristalinidad de las microfibras de celulosa son propiedades determinantes de las características físicas de la pared celular (McFarlane et al., 2014). La celulosa puede ser depolimerizada en residuos de D-glucopiranosos por medio de ácidos como el sulfúrico o el clorhídrico, y a temperaturas altas, alrededor de los 125°C, que permite el rompimiento de las interacciones moleculares dentro de la estructura (Badui Dergal, 2006). Aunque también es posible hidrolizarla mediante métodos enzimáticos, utilizando celulasas que escinden el enlace glucosídico β -1,4 (Bayer et al., 1998).

La celulosa es aislada de la pared celular de las plantas, compuesta principalmente de tres clases de polisacáridos: celulosa, hemicelulosa y pectinas; aunque también incluye otros compuestos químicos y proteínas (McFarlane et al., 2014).

La pared celular de las plantas es una estructura macromolecular compleja que rodea y protege a las células, y es una característica distintiva de las plantas y esencial para su supervivencia. La estructura de la pared celular formada por polisacáridos, proteínas, compuestos aromáticos y alifáticos permite a las plantas crecer en diversas condiciones ambientales (Caffall y Mohnen, 2009). En la Figura 3, se muestra la estructura de la pared celular de *Arabidopsis thaliana*.

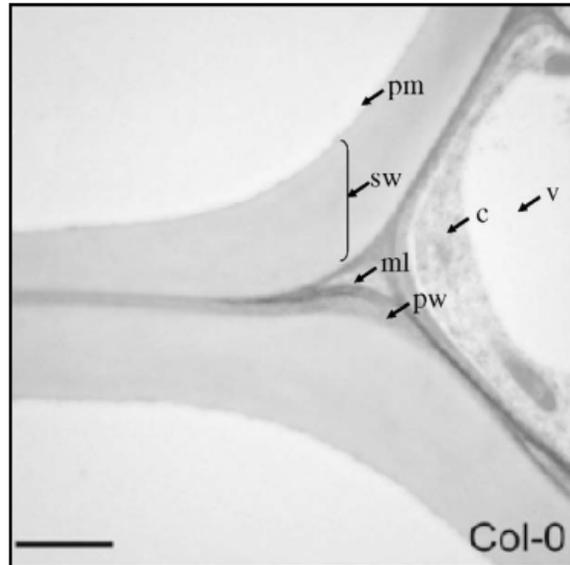


Figura 3. Pared celular de Arabidopsis thaliana.

Se muestran claramente delimitadas las siguientes estructuras: lamela media (ml), pared primaria (pw), y pared secundaria (sw). Adicionalmente se etiquetan la membrana plasmática (pm), el citosol (c), y la vacuola (v) (Caffall y Mohnen, 2009).

Aunque la celulosa es un material insoluble y resistente a muchos microorganismos y enzimas, debido a que se asocia normalmente con la lignina y otros polisacáridos no almidonosos lo que afecta la liberación de los arabinosilanos (AXs). Junto con la lignina y otras fibras, la celulosa forma una matriz de “lignocelulosa”, que es altamente resistente a la degradación (Lehtinen, 2012).

2.2.2. Hemicelulosa

La pared celular de las plantas es un complejo dinámico y altamente ordenado en un biopolímero que contiene homo y heteroglicanos estructuralmente relacionados en diversos contenidos, en función del desarrollo, la edad y el tipo de pared celular. Tres redes principales independientes pero que interactúan entre ellas que forman microdominios locales se pueden distinguir: celulosa-hemicelulosa, pectinas y proteínas estructurales de la pared celular (Fig. 4) (Capek et al., 2000).

Las hemicelulosas constituyen entre un 25 a 30% de la madera en peso seco (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). Las hemicelulosas pueden ser solubles o

insolubles en agua, estas últimas (pentosanos) representan alrededor del 5.8-6.6% del grano de maíz (Saldívar, 1996).

Este complejo heteropolisacárido se encuentra compuesto principalmente de pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa), usualmente están acetiladas para formar cadenas ramificadas, en adición al 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y ácido D-glucurónicos, condensados a través de enlaces glicosídicos β -1,4 y ocasionalmente β -1,3 (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). Las hemicelulosas incluyen xiloglucanos, xilano, glucomananos, galactoglucomananos y AXs (Capek et al., 2000).

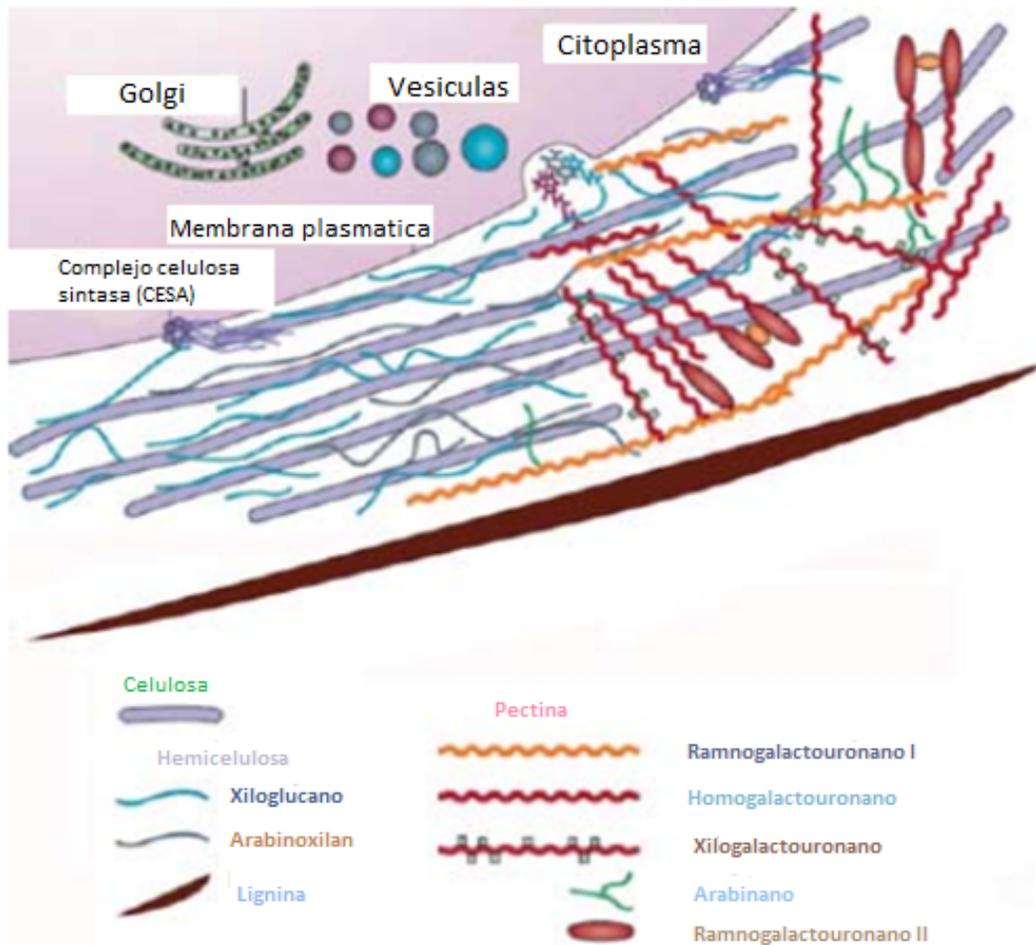


Figura 4. Composición de la pared celular de las plantas. Formada principalmente de celulosa, hemicelulosa y pectina unidas con lignina, un polímero fenólico. La lignina forma una matriz donde los polisacáridos están embebidos, esta estructura entre cruzada dificulta la degradación enzimática lo que les confiere protección a las plantas (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011).

Los xilanos son el componente más abundante de las hemicelulosas, alrededor del 70% en peso. Están formados por unidades de D-xilosa unidas mediante enlaces β -1,4, y puede contener diferentes sustituyentes, por ejemplo AXs si esta sustituido con arabinosa, o glucuronoxilanos y glucuronoarabinoxilanos si se encuentran sustituidos por glucosa o glucosa-arabinosa respectivamente (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011).

Los AXs están formados por una cadena principal de residuos de β -D-xilopiranosil unido por enlaces β -1,4. Cada residuo de xilosa puede estar sustituido en la posición C (O)-2 y/o en la posición C (O)-3 con residuos de α -L-arabinofuranosil. La mayoría de las cadenas laterales consisten en un sólo residuo de arabinofuranosil.

Se ha reportado que los AXs se encuentran en los granos de los cereales como el trigo, arroz, cebada, avena, centeno, sorgo maíz y mijo. Los AXs son el principal polisacárido no alimodonoso y se encuentra localizados en la pared celular del endospermo, en la capa aleurona, en el salvado y en la cáscara. El contenido de AXs varía con respecto a los factores ambientales y genéticos de la planta. El contenido total de AXs reportado en harina de trigo es de 1.37% y en salvado de maíz es de 29.86% (Niño-Medina et al., 2010).

Los arabinoxilanos pueden clasificar en función de su solubilidad en aquellos que son extraíbles en agua (WEAX) y los no extraíbles en agua (WUAX). Los WEAX se encuentran principalmente en el endospermo. Los WUAX se ubican en la capa aleurona y en el pericarpio, son los de mayor peso molecular debido a la diversidad de cadenas laterales, ya que además de arabinosa contienen ácido glucurónico, galactosa y grupos acetilo (Morales-Ortega et al., 2013). Se han reportado variaciones en los pesos moleculares de WUAX del pericarpio de maíz entre 124 y 270 kDa con distintos métodos de extracción (Lapierre et al., 2001).

Las propiedades estructurales de los AXs pueden variar dependiendo del genotipo o el origen celular, incluyendo la proporción de los residuos de arabinosa (Ara) y xilosa (Xyl), la cantidad relativa y la secuencia de los sustituyentes de β -D-xilopiranosil, o la presencia de otros sustituyentes como el ácido ferúlico (Figura 5) (Izydorczyk y Dexter, 2008).

La proporción de los residuos de Ara/Xyl indica el grado de ramificación en la cadena del polímero, en el caso de los cereales esta proporción va desde el 0.3 al 1.1, aunque varía dependiendo del tipo de pared celular, género de tejido vegetal y los estadios de desarrollo (madurez). Por ejemplo, la proporción de AXs sustituidos con arabinosa en la capa externa del pericarpio y el escutelo, es relativamente alta ($Ara/Xyl > 1$), mientras que en la capa de aleurona disminuye ($Ara/Xyl < 0.5$), y la capa de hialina se encuentra pobremente sustituida ($Ara/Xyl < 0.3$) (Izydorczyk y Dexter, 2008). Esta proporción es muy importante para la solubilidad de los AXs, debido a que los residuos de Ara favorecen la interacción del polisacárido con el agua, sin estos sustituyentes las cadenas de xilosa forman interacciones estables entre las cadenas, dando como resultado agregados insolubles y de una estructura muy rígida (Morales-Ortega et al., 2013).

Comúnmente los AXs se extraen de las plantas por tratamientos alcalinos o acuosos dependiendo del tejido específico de la planta. En la matriz de la pared celular, los AXs se encuentran unidos por enlaces no covalentes y covalentes entre ellos y a otros componentes estructurales de la pared celular. Por lo tanto, los AXs son insolubles en medios acuosos (Niño-Medina et al., 2010).

Por esta razón, se han buscado nuevas alternativas para la liberación de los AXs, como los tratamientos enzimáticos que faciliten la eliminación de las proteínas y el almidón. La completa degradación de los AXs requiere la acción cooperativa de dos grupos de enzimas despolimerizantes, las que hidrolizan el esqueleto del xilano, y las enzimas de escisión de los grupos laterales, que como su nombre lo dice remueven los grupos laterales del esqueleto de xilano (Dornez, 2007).

Recientemente, los procesos de extracción de AXs se han enfocado en los residuos agroindustriales como el salvado de cereales, pulpa de la remolacha azucarera, olote de maíz, cáscara de banana, entre otro. Debido a que estos materiales son ricos en polisacáridos no celulósicos, siendo altamente ricos en AXs (Niño-Medina et al., 2010).

El valor comercial de los AXs se debe principalmente a sus aplicaciones como ingredientes alimentarios, pero han ido surgiendo nuevas perspectivas en muchos sectores industriales, tales como cosméticos, productos farmacéuticos, materiales (sobre todo en la

formación de películas), en la química tradicional y en la química verde, etc. (Aguedo et al., 2014).

Por otra parte, el carácter prebiótico de los arabinoxilano oligosacáridos (AXOS) ha atraído gran interés en el campo de la nutrición, tanto en la investigación científica como para sus aplicaciones en alimentos o como aditivo (Aguedo et al., 2014).

Un segundo beneficio potencial para la salud puede ser consecuencia de los ácidos fenólicos asociados a AXs. Según estudios epidemiológicos, el consumo de arabinoxilanos ferulados obtenidos de los cereales se asocia a un menor riesgo de cáncer colon rectal y cánceres gástricos debido a sus ácidos fenólicos (Lehtinen, 2012). Debido a que estos presentan una fuerte actividad antioxidante y anti-inflamatoria, ayudando en la eliminación de radicales libres (Aguedo et al., 2014).

En adición, los xilanos pueden contener arabinosa, ácido glucurónico o ácido 4-O-metil éter-glucurónico y ácido acético, ferúlico o p-cumárico (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallo, 2011). El ácido ferúlico, es un éster unido al C(O)-5 de los residuos de arabinosa, puede formar enlaces éster y éter, siendo clave en la unión de los AXs con otras macromoléculas de la pared celular (Figura 5) (Dornez, 2007; Roets, 2009; Valencia Ojeda, 2013).

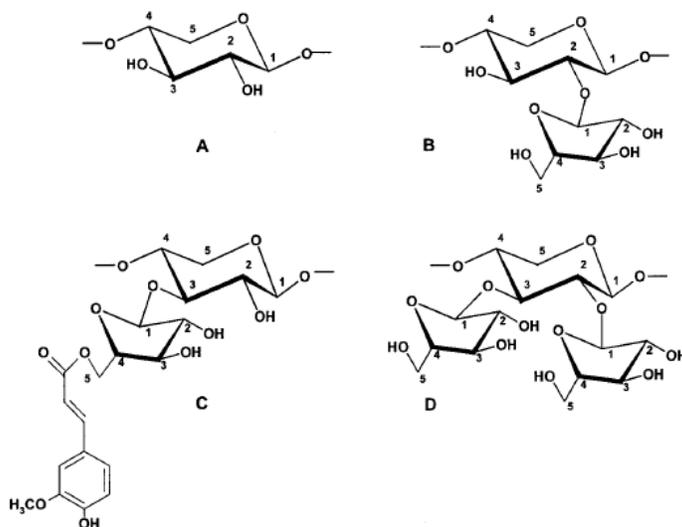


Figura 5. Elementos estructurales del AX: A) residuo de β-D-xilopiranosil, B) y D) residuo de D-xilopiranosil sustituido con residuos de L-arabinoxilano, C) unión del ácido ferúlico al residuo de L-arabinofuranosil (Izydorczyk y Dexter, 2008).

La importancia de la hemicelulosa consiste en la unión entre las fibras de lignina y celulosa, lo que le confiere la rigidez a la matriz de celulosa-hemicelulosa-lignina (Quiroz-Castañeda y Folch-Mallol, 2011). Se ha reportado que la rigidez de esta matriz asociada física y químicamente, dificulta el acceso de las enzimas encargadas de liberación de los arabinoxilanos, por lo tanto reducen la eficiencia de la hidrólisis (Mussatto et al., 2008).

2.3. Pectinas

Las sustancias pécticas incluyen un grupo muy extenso de heteropolisacáridos de estructura compleja con una estructura lineal principal construida de unidades de ácido α -D-galacturonano con regiones alternantes de ácido α -D-galacturónico y residuos de α -L-ramnopiranosil (Capek et al., 2000; Badui Dergal, 2006). El ácido galacturónico comprende el 70% de la pectina y todos los polisacáridos pécticos contiene ácido galacturónico (Mohnen, 2008). Las regiones ramificadas esta unidas mediante enlaces covalentes a las fracciones de residuos de arabinosa y galactosa creando heteropolisacáridos más complejos formados de ramnogalacturonano con arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Capek et al., 2000).

Por definición las pectinas son ácido pécticos con diferentes grados de esterificación y neutralización. Los compuestos altamente esterificados son aquellos que se encuentran en los frutos inmaduros y a esto se debe la rigidez del material (Badui Dergal, 2006).

Las pectinas están altamente asociadas a la celulosa y la hemicelulosa, además pueden interactuar vía puentes de hidrógeno lo que le confiere la firmeza característica a la pared celular de las plantas (Badui Dergal, 2006; McFarlane et al., 2014). Las pectinas junto con las hemicelulosas forman una matriz de polisacáridos solubles encargados de llenar los vacíos entre las microfibrillas de celulosa y unir a éstas entre sí (McFarlane et al., 2014).

Dentro de las diferentes clases estructurales de polisacáridos pécticos encontramos a los homogalacturonanos (HG), xilogalacturonano (XGA), apiogalacturonano (AGA), ramnogalacturonano (RG-I) y ramnogalacturonano (RG-II) (Caffall y Mohnen, 2009).

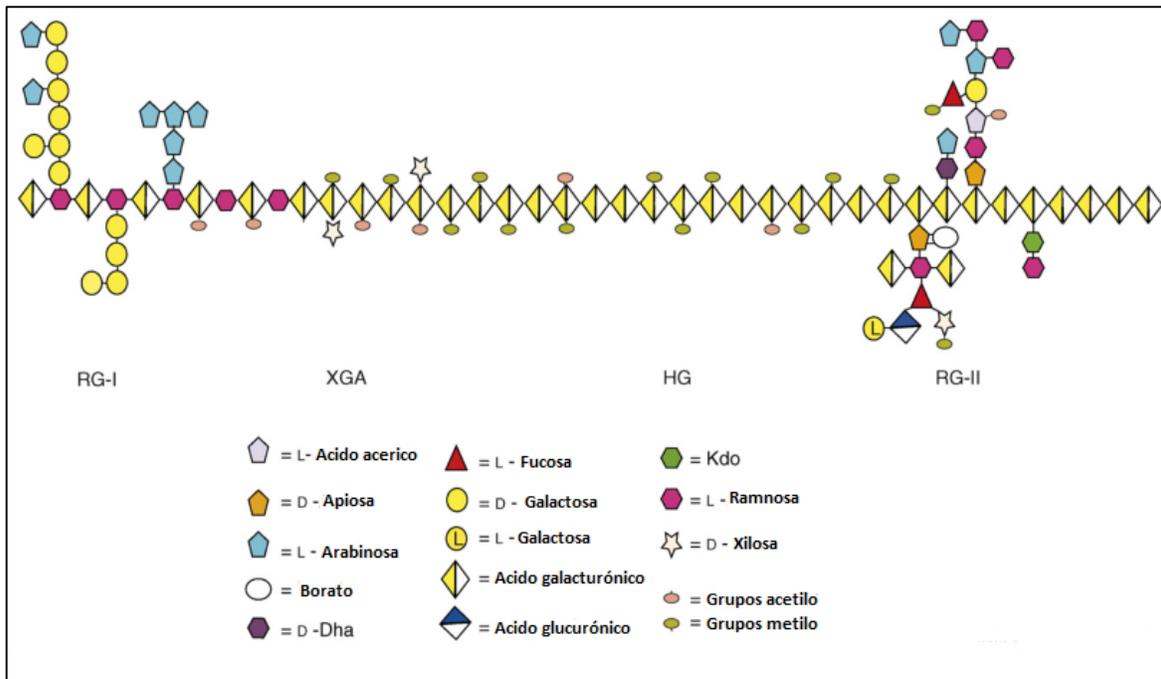


Figura 6. Estructura esquemática de la pectina mostrando los polisacáridos péclicos: homogalacturonano (HG), xilogalacturonano (XGA), ramnogalacturonano I (RG-I) y ramnogalacturonano II (RG-II) unidos entre ellos (Caffall y Mohnen, 2009).

2.3.1.1. Homogalacturonano

Es el polisacárido péclico más abundante, es un homopolímero de ácido galacturónico unido por enlaces α -1,4 que comprende alrededor del 65% de la pectina (Mohnen, 2008). Los residuos de ácido galacturónico del homogalacturonano pueden estar metil-esterificados en el C-6 y presentar grupos acetilo en el O-2 y O-3 (Vincken et al., 2003). Se ha demostrado la presencia de residuos de ácido galacturónico de una longitud aproximada de 100 residuos en los homopolisacáridos, aunque también se han detectado regiones de menor tamaño intercalados entre los polisacáridos péclicos (Mohnen, 2008).

2.3.1.2. Xilogalacturonano

Es un polímero de galacturonano con ramificaciones de unidades de β -D-xilopiranosil en las cadenas laterales. El grado de residuos puede variar entre un 25% (sandía [*Citrullis vulgaris*]) y un 75% (manzana [*Malus domestica*]). Al igual que en el

homogalacturonano los residuos pueden estar metil-esterificados (Vincken et al., 2003). Recientemente se ha identificado que el gen del xilogalacturonano es regulado en respuesta a los ataques patógenos, lo que sugiere que algunos de los homogalacturonanos sustituidos, como el xilogalacturonano, pueden tener la capacidad de hacer más resistente el material a la degradación por las endopoligalacturonasas producidas durante el ataque (Mohnen, 2008).

2.3.1.3. Apiogalacturonano

Consiste en un polímero de homogalacturonano sustituido en sus cadenas laterales por unidades de D-apiofuranosa (Mohnen, 2008). El polímero de apiogalacturonano está formado por una cadena principal de ácido galacturónico unido por enlaces α -1,4, a esta se unen las cadenas laterales formadas por residuos de apiosa y apiobiosa (D-apiofuranosil- β -1,4-D-apiosa) en el O-2 o O-3 (Longland et al., 1989).

2.3.1.4. Ramnogalacturonano I (RG-I)

El RG-I representa entre el 20-35% de la pectina. Está formado por una cadena principal de un disacárido repetido ($-\alpha$ -D-GalA-1,2- α -L-Rha-1,4-) y exhibe un alto grado de tipos de células y una expresión dependiente del desarrollo en cuanto al número de azúcares, enlaces glucosídicos, oligosacáridos, y oligosacáridos ramificados unidos a la cadena principal (Pérez et al., 2003; Mohnen, 2008).

2.3.1.5. Ramnogalacturonano II (RG-II)

El RG-II es el polisacárido péctico estructural más complejo, representa cerca del 10% de la pectina. Su estructura está altamente conservada a través de las especies de plantas, y consiste de un cadena principal de homogalacturonano de por lo menos 8 residuos o más, de ácido D-galacturónico unidos por enlaces α -1,4 con cadenas laterales formadas de 12 tipos diferentes de azúcares con más de 20 enlaces diferentes (Mohnen, 2008).

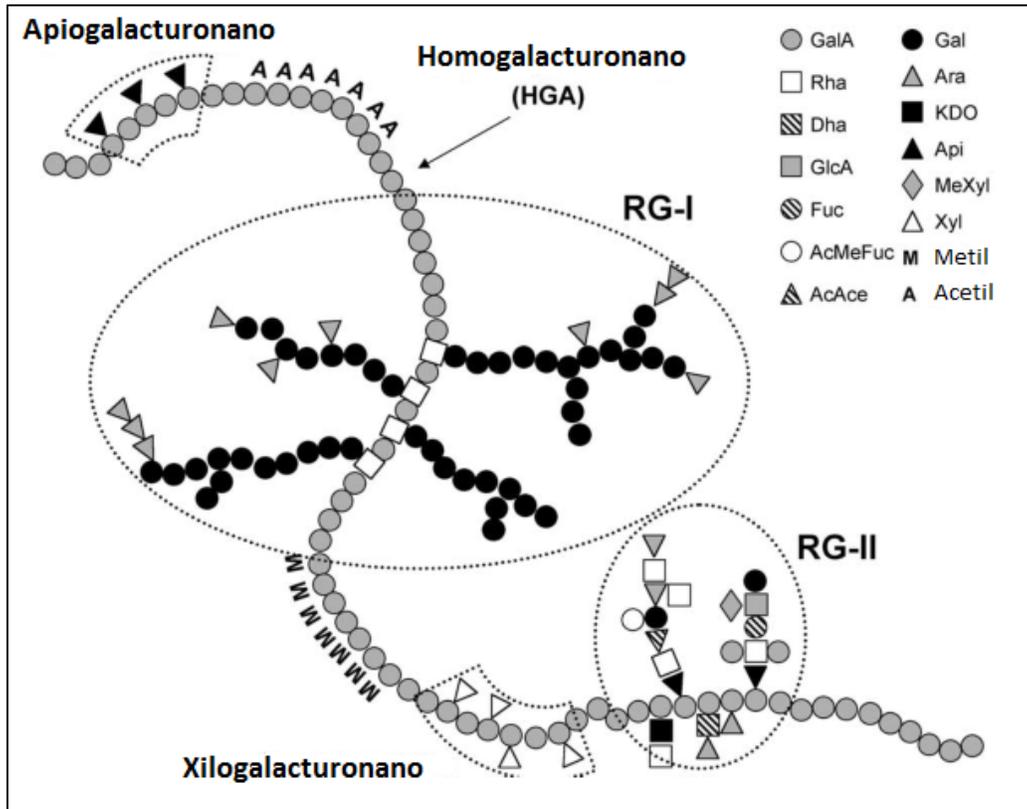


Figura 7. Representación esquemática de la estructura primaria de las pectinas (Pérez et al., 2003).

Los polisacáridos pécticos de la pared celular de las plantas juegan un papel importante durante el crecimiento y desarrollo de las plantas, contribuyendo en la integridad estructural, adhesión de la célula y mediación de las respuestas de defensa (Caffall y Mohnen, 2009). Además se utilizan como polímeros gelificantes y estabilizadores en diversos alimentos y productos especiales con efectos positivos en la salud humana y múltiples usos biomédicos (Mohnen, 2008).

Las pectinas se encuentran en la mayoría de los frutos inmaduros y en algunos tejidos suaves como la cáscara de los cítricos, en las manzanas y las peras. Industrialmente son utilizadas para la elaboración de mermeladas y jaleas (bajo grado de esterificación), gelatinas (alto grado de esterificación) y en la elaboración de bebidas (Badui Dergal, 2006).

2.4. Enzimas

2.4.1. Xilanasas

La degradación completa del xilano requiere la acción de una gran variedad de enzimas hidrolíticas. Las enzimas que cortan la hemicelulosa son llamadas hemicelulasas. Son clasificadas de acuerdo al sustrato sobre el cual actúan, siendo la enzima más importante la endo-1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), que inicia la conversión del xilano en xilooligosacáridos (Pastor et al., 2007).

La degradación de la cadena principal de xilosa depende de las xilanasas (exo y endo xilanasas), que escinden las uniones entre el polímero y las β -xilosidasas que liberan unidades de xilosa, xilobiosa y xilooligómeros. La remoción de las cadenas laterales del xilano es catalizado por α -D-glucuronidasas, acetyl-xilano esterasas, ácido ferúlico esterasas y ácido p-coumárico esterasas (Figura 1) (Valencia Ojeda, 2013).

2.3.1.1. Exo- β -(1 \rightarrow 4)-xilanasas (EC 3.2.1.37)

Las exoxilanasas actúan sobre el esqueleto de xilano reduciendo la cadena desde el extremo terminal lo que produce oligómeros de cadena corta o hidrolizando xilooligómeros de cadena corta (Juturu y Wu, 2014).

2.3.1.2. Endo- β -(1 \rightarrow 4)-D-xilanasas (EC 3.2.1.8)

Estas enzimas escinden al azar en la cadena de xilano para liberar xilooligosacáridos con cadenas de distintas longitudes.

2.3.1.3. β -Xilosidasas o xilobiasas (EC 3.2.1.37)

Estas enzimas hidrolizan a los 1,4- β -xilooligosacáridos liberando los residuos de D-xilosa desde extremo no reductor de la cadena de xilano (Collins et al., 2005).

2.3.1.4. α -Arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55)

Son las enzimas que escinden los grupos terminales no reductores α -L-arabinofuranosil de arabinanos, arabinoxilanos y arabinogalactanos.

2.3.1.5. α -D-glucuronidasas (EC 3.2.1.1)

Permiten la hidrólisis de los enlaces α -1,2-glicosídicos entre la xilosa y el ácido D-glucurónico o su unión 4-O-metil éter.

2.3.2. Esterasas

Las acetil-xilano esterasas (EC 3.1.1.72) eliminan los grupos acetilo del xilano. Juegan un papel importante en la hidrólisis del xilano ya que los grupos acetilo pueden dificultar la aproximación de las enzimas que escinden la cadena principal de xilano, por lo tanto, la eliminación de estos, facilita la acción de las xilanasas (Pastor et al., 2007). Las esterasas rompen las uniones de xilosa con ácido acético [acetil xilano esterasa (EC 3.1.1.6)], las cadenas laterales de residuos de arabinosa con ácido ferúlico [feruloil esterasa (EC 3.1.1.73)] y cadenas laterales de residuos de arabinosa a ácido p-coumárico (p-coumaroil esterasa) (Valencia Ojeda, 2013).

2.3.3. Celulasas

Las celulasas son un sistema complejo de enzimas que hidrolizan las uniones β -1,4 de los glucanos (enlaces glucosídicos) y se encuentran en la naturaleza en microorganismos que atacan a las plantas, así como en el sistema digestivo de los animales herbívoros (Bayer et al., 1998; Badui Dergal, 2006). Se encuentran clasificadas por familias, de acuerdo con la secuencia de aminoácidos similares y sus dominios catalíticos (Bayer et al., 1998). Las enzimas celulolíticas se agrupan en al menos 15 de las más de 80 familias estructurales conocidas de glicosilhidrolasas (Rabinovich et al., 2002; Sadhu y Maiti, 2013).

2.3.3.1. Endoglucanasas o Endo-1,4- β -D-Glucano Glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4)

Estas endoglucanasas cortan al azar los sitios internos amorfos en las cadenas de polisacáridos de celulosa, generando oligosacáridos de varias longitudes y consecuentemente nuevos extremos en las cadenas. Este grupo de enzimas son generalmente activas contra la celulosa amorfa, derivados solubles de celulosa como la carboximetil celulosa y celooligosacáridos (Sadhu y Maiti, 2013).

2.3.3.2. Exoglucanasas o 1,4- β -D-Glucano celobiohidrolasas (Celobiohidrolasas) (EC 3.2.1.91)

Las exoglucanasas hidrolizan los extremos reductores y no reductores de las cadenas de los polisacáridos de celulosa, por lo que se liberan como productos principales glucosa (glucanohidrolasas), o celobiosa (celobiohidrolasas). Estas enzimas presentan actividad contra sustratos cristalinos como el Avicel, celulosas amorgas y celooligosacáridos. Sin embargo, son inactivas contra la celobiosa o celulosas sustituidas solubles como la carboximetil celulosa (Sadhu y Maiti, 2013).

2.3.3.3. Exoglucanasas o 1,4- β -D-Oligoglucano Celobiohidrolasas (Celodextrinasas) (EC 3.2.1.74)

Este grupo de enzimas catalizan la remoción de celobiosa de celooligosacáridos o de p-nitrofenil- β -D-celobiósido pero inactivas contra celulosas amorfas o carboximetil celulosa (Sadhu y Maiti, 2013).

2.3.3.4. β -Glucosidasas o β -D-Glucósido Glucohidrolasas (EC 3.2.1.21)

Las β -Glucosidasas hidrolizan las celodextrinas y celobiosas solubles en unidades de glucosa con extremos no reductores. Son inactivas contra celulosas amorfas y cristalinas (Sadhu y Maiti, 2013).

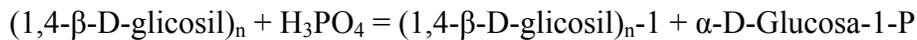
2.3.3.5. Celobiosa Fosforilasa o Celobiosa: Ortofosfato α -D-Glicosil Transferasa (EC 2.4.1.20)

Estas enzimas catalizan la escisión fosforolítica reversible de celobiosa.



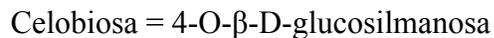
2.3.3.6. Celodextrina Fosforilasa o 1,4- β -D-Oligoglucano Ortofosfato α -D-Glicosil Transferasa (EC 2.4.1.49)

Se encuentran en las células de *Clostridium thermocellulam*. No actúan sobre la celobiosa pero catalizan la escisión fosforolítica reversible de las celodextrinas que van desde celotriosas a celohexosas.



2.3.3.7. Celobiosa Epimerasa (EC 5.1.3.11)

Se reportó por primera vez en las células de *Ruminococcus albus*. Catalizan la siguiente reacción:



2.3.4. Pectinasas

Las pectinasas son enzimas que hidrolizan las sustancias pécticas. Las aplicaciones comerciales fueron primeramente observadas en 1930 para la preparación de vinos y jugos de frutas. Estas enzimas son las responsables de la degradación de largas y complejas moléculas llamadas pectinas que se encuentran como polisacáridos estructurales en la lamela media y en la pared celular primaria de las células de las plantas jóvenes (Kashyap et al., 2001; Jayani et al., 2005).

2.3.4.1. Pectinesterasas (PE) E.C. 3.1.1.11

También conocidas como pectinmetil hidrolasas, catalizan la desesterificación del grupo metoxil de la pectina formando ácido péctico. Las enzimas actúan preferentemente en el grupo metil éster de las unidades de galactúronato siguiente a la unidad no esterificada de galactúronato.

2.3.4.2. Polimetilgalactúronasa (PMG)

Catalizan la escisión hidrolítica de los enlaces α -1, 4-glicosídicos.

2.3.4.3. Endopolimetilgalactúronasa (Endo-PMG) E.C. 3.2.1.41

Escinden al azar los enlaces α -1, 4-glicosídicos de pectina, preferentemente los que se encuentran altamente esterificados.

2.3.4.4. Exopolimetilgalactúronasa (Exo-PMG)

Escinden secuencialmente los enlaces α -1, 4-glicosídicos de la pectina de los extremos no reductores de la cadena de pectina.

2.3.4.5. Poligalactúronasas (PG)

Este grupo de enzimas cataliza la hidrólisis de los enlaces α -1, 4-glicosídicos en el ácido péctico (ácido poligalactúronico).

2.3.4.6. Endopoligalactúronasas (Endo-PG) E.C. 3.2.1.15

También conocidas como poliglicanohidrolasas, catalizan la hidrólisis al azar de los enlaces α -1, 4-glicosídicos en el ácido péctico.

2.3.4.7. Exopoligalactúronasas (Exo-PG) E.C. 3.2.1.67

También conocidas como poligalactúronohidrolasas, catalizan la hidrólisis de manera secuencial de los enlaces α -1, 4-glicosídicos en el ácido péctico.

2.3.4.8. Polimetilgalactúronato liasas (PMGL) E.C.4.2.2.10

Catalizan el rompimiento de la pectina por escisión trans-eliminativa (transeliminadas). Se caracterizan por el rompimiento no hidrolítico de los pectatos o péctinatos.

2.3.4.9. Endopolimetilgalactúronato liasas (Endo-PMGL) E.C.4.2.2.10

Catalizan la escisión al azar de los enlaces α -1, 4-glicosídicos en la pectina. También se conocen como poli metoxigalactúronido liasas.

2.3.4.10. Exopolimetilgalactúronato liasas (Exo-PMGL) E.C.4.2.2.10

Cataliza la ruptura gradual de la pectina por escisión trans-eliminativa.

2.3.4.11. Poligalactúronato liasas (PGL) E.C.4.2.2.2

Catalizan la escisión de los enlaces α -1, 4-glicosídicos en el ácido péctico por trans-eliminación.

2.3.4.12. Endopoligalactúronato liasas (Endo-PGL) E.C. 4.2.2.2

Catalizan la escisión al azar de los enlaces α -1, 4-glicosídicos en el ácido péctico. También se conocen como poli 1,4- α -D-galactúronido liasas.

2.3.4.13. Exopoligalactúronato liasas (Exo-PGL) E.C. 4.2.2.9

También conocidas como poli 1,4- α -D-galactúronido exoliasas, catalizan la escisión secuencial de los enlaces α -1, 4-glicosídicos en el ácido péctico.

2.3.4.14. Protopectinasas (PPasas) E.C. 3.2.1.99

Estas enzimas solubilizan la protopéctina formando pectina soluble altamente polimerizada. Con base en su aplicación se clasifican principalmente en dos tipos: pectinasas ácidas y pectinasas alcalinas.

2.4. Condiciones que afectan la actividad enzimática

La actividad enzimática depende fundamentalmente de los iones hidronio del medio, debido a que afecta el grado de ionización de los aminoácidos de la proteína, incluyen en el sitio activo, del sustrato, o del complejo enzima-sustrato. El pH influye sobre la estructura tridimensional de la proteína, condicionando a su vez la afinidad enzima-sustrato (Badui Dergal, 2006).

En general las enzimas tienen un rango de pH donde presentan su actividad óptima, desactivando o disminuyendo significativamente su actividad en pHs extremos, aunque existen algunas enzimas tolerantes a condiciones extremas (Beg et al., 2001; Badui Dergal, 2006).

El efecto de la temperatura es muy importante, ya que incrementa la velocidad de las reacciones enzimáticas, al aumentar la energía cinética de las moléculas. Esto ocurre solo en temperaturas donde la enzima es estable y mantiene su capacidad catalítica, en temperaturas extremas es posible que la enzima se desnaturalice y pierda su actividad enzimática (Badui Dergal, 2006).

El aumento de la temperatura afecta la solubilidad de los gases (oxígeno), el pH de la solución amortiguadora, la afinidad enzima-sustrato, así como la presencia de reacciones de competencia (Badui Dergal, 2006). Por estas razones, es importante determinar el valor óptimo de temperatura donde se obtenga la mayor actividad de las enzimas.

La concentración de sustrato también tiene un efecto importante sobre la actividad de las enzimas. Cuando se tiene una concentración en exceso de sustrato con respecto a la concentración de enzima, se obtiene la velocidad máxima de reacción debido a que las colisiones con el sustrato son más frecuentes (Badui Dergal, 2006). Una vez que se alcanzado la velocidad máxima, cualquier aumento en la concentración de sustrato no tendrá un efecto significativo en la velocidad de reacción.

Así mismo, la actividad de algunas enzimas depende de otras moléculas no proteicas llamadas cofactores. Estos cofactores pueden ser iones metálicos, un complejo metálico, o una molécula orgánica compleja (Ochiai, 1984). El efecto activador de los

cofactores se debe a que algunas veces forman parte del sitio activo, y se requieren para la interacción de la enzima con el sustrato, o ayudan a mantener la estructura tridimensional de la enzima (Badui Dergal, 2006). En la Tabla 2, se muestra las condiciones óptimas de algunas xilanasas.

Tabla 2. Características de las xilanasas de diferentes microorganismos (Beg et al., 2001).

Microorganismo	Peso Molecular (kDa)	Óptimo		Estabilidad		pI	Km (mg/ml)	Vmax (μM/min per mg)	Referencias
		pH	T (°C)	pH	T (°C)				
<i>Aspergillus sydowii</i> MG 49	30	5.5	60	-	-	-	-	-	Ghosh and Nanda 1994
<i>Cephaloporum</i> sp.	30, 70	8	40	8-10	-	-	0.15	-	Bansod et al. 1993
<i>Fusarium oxysporum</i>	20.8, 23.5	6	50, 55	7-10	30	-	9.5; 8.45, 8,7	0.41, 0.37	Christakopoulos et al. 1996
<i>Geotrichum candidum</i>	60-67	4	50	3-4.5	45	3.4	-	-	Radionova et al. 2000
<i>Paecilomyces varioti</i>	20	4	50	-	-	5.2	49.5	-	Kelly et al. 1989
<i>Penicillium purpurogenum</i>	33, 23	7, 3.5	60, 50	6-7.5, 4.5-7.5	40	8.6, 5.9	-	-	Belancic et al. 1995
<i>Thermomyces lanuginosus</i> DSM 5826	25.5	7	60-70	5-9	60	4.1	7.3	-	Cesar and Mrsa 1996
<i>Thermomyces lanuginosus</i> - SSBP	23.6	6.5	70-75	5-12	60	3.8	3.26	6300	Lin et al. 1999
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	5	50	-	40	-	0.58	0.106	Tan et al. 1985
<i>Trichoderma reesei</i>	20, 19	5-5.5, 4-4.5	45, 40	2.5-8.5	-	9, 5.5	3-6.8, 14.8-22.3	-	Tenkanen et al. 1992
<i>Yeast</i>									
<i>Aureobasidium pullulans</i> Y-2311-1	25	4.4	54	4.5	55	9.4	7.6	2650	Li et al. 1993
<i>Cryptococcus albidus</i>	48	5	25	-	-	-	5.7, 5.3	-	Morosoli et al. 1986
<i>Trichosporon cutaneum</i> SL409	-	6.5	50	4.5-8.5	50	-	-	-	Liu et al. 1998
<i>Actinomycete</i>									
<i>Streptomyces</i> sp. EC 10	32	7-8	60	-	-	6.8	3	-	Lumba and Pennickx 1992
<i>Streptomyces</i> sp. B-12-2	23.8-40.5	6-7	55-60	-	-	4.8-8.3	0.8-5.8	162-470	Elegir et al. 1994
<i>Streptomyces</i> T7	20	4.5-5.5	60	5	37-50	7.8	10	7610	Kesker 1992

2.5. Cavitación Hidrodinámica

La cavitación hidrodinámica (HC) se genera por el simple paso del líquido a través de una constricción como una válvula de estrangulamiento, una placa de orificio, un Venturi, etc. Cuando el líquido pasa a través de la constricción, la energía cinética o velocidad de líquido incrementa como resultado de la presión. Si el estrangulamiento es suficiente para

que la presión alrededor del punto de la constricción caiga por debajo de la presión necesaria para la cavitación (presión de vapor del medio a la temperatura de funcionamiento), se generaran millones de cavidades. Posteriormente, el chorro del líquido se expande y la presión se recupera (Gogate y Pandit, 2005).

El comportamiento de las burbujas, y por lo tanto el pulso de presión generado para el colapso de las cavidades de la HC depende de las condiciones de operación, así como de la geometría de la constricción mecánica, la cual resulta en la generación de las condiciones de cavitación río abajo del orificio. Las burbujas cavitantes liberan energía en forma localizada a través de la emisión de ondas de choque que explotan violentamente, y en consecuencia provocan rompimiento de las partículas sólidas (Gogate y Pandit, 2005).

Debido a las condiciones mecánicas y las temperaturas que se generan, la cavitación hidrodinámica ha sido utilizada en los últimos años en operaciones de disrupción celular para la producción a gran escala de productos biotecnológicos atrapados en medios intracelulares. Así mismo, ha sido utilizada como herramienta en procesos de desinfección microbiana, en el tratamiento de aguas residuales, en procesos de cristalización, en la deslignificación de paredes celulares, en la producción de biodiesel y bioetanol, etc. (Gogate y Kabadi, 2009; Kim et al., 2015).

2.6. Objetivos, pregunta de investigación e hipótesis

2.7.1. Hipótesis

Es posible producir arabinosilanos a partir de pericarpio de maíz mediante un proceso de cavitación hidrodinámica acoplado a un tratamiento enzimático para evaluar el rendimiento de extracción comparado con los métodos tradicionales con base en un diseño de experimentos.

2.7.2. Objetivo

Definir los parámetros del proceso de cavitación hidrodinámica acoplada a un tratamiento enzimático para la hidrólisis del pericarpio de maíz permitiendo la liberación de los arabinoxilanos.

2.7.3. Objetivos específicos

Caracterizar de los extractos enzimáticos para su utilización en la hidrólisis del pericarpio de maíz.

Desarrollar un pretratamiento que permita extraer la zeína del pericarpio de maíz.

Establecer las condiciones del proceso de cavitación hidrodinámica para la degradación del pericarpio de maíz.

Establecer las condiciones del tratamiento enzimático para la degradación del pericarpio de maíz.

3. METODOLOGÍA

3.1. Condiciones del Experimento

3.1.1. Lugar donde se realizó el estudio

El presente trabajo se realizó en los Laboratorios del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos (DIPA) de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), en el Laboratorio de Bioquímica de Alimentos del Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC), y en la planta de Coyotefoods, Biopolymer and Biotechnology, S. de R. L. MI. Saltillo, Coahuila.

3.1.1. Materia Prima

Se utilizó pericarpio de maíz troceado Zean Bran C75 (Fig. 8) proporcionado por Industrias Centli, S. A. de C. V.



Figura 8. Pericarpio de maíz troceado Zea Bran C75.

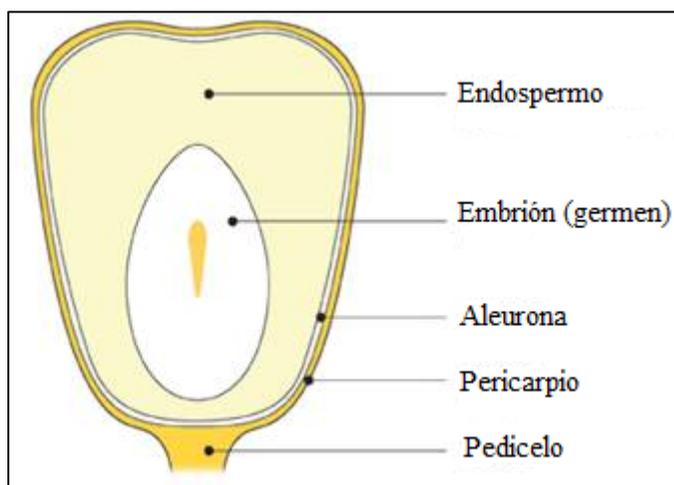


Figura 9. Estructura del grano de maíz (Micklos, 2015).

3.2. Equipo

Agitador magnético

Agitador Vortex

Balanza Analítica

Baño María

Colorímetro

Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detector amperométrico (HPAEC-PAD) (DIONEX ICS-5000) (Columna CarboPac PA200)

Destilador automático tipo Kjeldahl

Equipo de Cavitación Hidrodinámica (Tekmash)

Equipo de Digestión Tradicional Kjeldahl

Espectrofotómetro para celdilla

Espectrofotómetro para microplaca

Estufa de gas

Extractor de fibra cruda

Extractor Soxhlet

Hidrolizador de muestras

Incubadora

Micropipetas de volumen variable de 0.5-10 μL .

Micropipetas de volumen variable de 100-1000 μL .

Micropipetas de volumen variable de 20-200 μL .

Micropipetas de volumen variable de 2-20 μL .

Mufla

Mufla de alta temperatura

Parrilla de calentamiento con agitación magnética

pH-metro

3.3. Material

Desecador

Filtros (0.7 μm)

Matraces Erlenmeyer

Microplaca con 96 pozos de 300 μL .

Puntas para micropipetas de volumen variable de 0.5-10 μL .

Puntas para micropipetas de volumen variable de 100-1000 μL .

Puntas para micropipetas de volumen variable de 20-200 μL .

Puntas para micropipetas de volumen variable de 2-20 μL .

Termómetro.

Tubos de ensayo 13x100.

Tubos de ensayo con tapón con rosca

Tubos eppendorf de 1.5 ml.

Vasos Berzelius

Vasos de precipitados

3.4. Reactivos

2-nitrofenol- β -D-glucopiranosido (Gold Biotechnology, Inc.)

Ácido Gálico

Ácido Poligalacturónico (Sigma-Aldrich, P-1879)

Ácido sulfúrico (J.T. Baker)

Ácido trifluoroacético (J.T. Baker)

Agua desionizada

Agua destilada

Albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich)

Almidón (J.T. Baker)

Arabinano (Remolacha azucarera) (Megazyme, Lote: 80902a)

Arabinoxilanos de harina de trigo (Megazyme, P-WAXYM)

Carbonato de Sodio (Fermont)

Carboximetil celulosa (MPBio, Cat: 101278)

Celulosa microcristalina (Sigma-Aldrich, Cas: 9004-34-6id06)

Dextrano de *Leuconostoc mesenteroides* (Sigma-Aldrich Lote 1382460V)

Fucoidano (de *Fucus vesiculosus*) (Sigma-Aldrich)

Galactano péctico (patata) (Megazyme, Lote: 80503c)

Hidróxido de Sodio (Macron Fine Chemicals)

Inulina (MPBio, Cat: 198971)

Inulina de Agave (Edulag)

Orcinol 3,5 dihydroxitolueno (Merck)
Pectina (MPBio, Cat: 102587)
Propilenglicol (Sigma-Aldrich)
Quitina Soluble en Agua (Amicogen Inc., Lote 071000)
Quitosan 20 KDa (Amicogen Inc., Lote 060417)
Ramnagalactouronano (fibra péctica de haba de soja) (Megazyme, Lote: 20202a)
Reactivo de Folin-Ciocalteu
Sulfato Cúprico (J.T. Baker)
Tartrato de Sodio y Potasio (J.T. Baker)
Verde de bromocresol (Faga Lab)
Xilano de madera de abedul (Sigma-Aldrich, X0502)
Xiloglucano (Tamarind xyloglucan, Dainippon Pharmaceutical Co. LTD. Lot. 040202A)

3.4.1. Enzimas

Acid Protease II (Amano Enzyme Inc.).
Endoproteasa (Megazyme).
Hemicellulase (Amano Enzyme Inc.).
Lacase (Amano Enzyme Inc.).
Macerozyme A (Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.).
Naringinase (Amano Pharmaceutical Co. Ltd.).
Onozuka (Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.).
Pectolyase (Kikkoman Corporation).
Protease M (Amano Enzyme Inc.).
Tannase KTFH (Kikkoman Corporation).
Veron 191 (AB Enzymes).
Xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich, X2753, CAS: 37278-89-0, Lote: SLBC5352V).

3.5. Método

3.5.1. Selección de la enzima

3.5.1.1. Cuantificación de azúcares reductores

La actividad enzimática fue determinada por la cuantificación espectrofotométrica de los azúcares reductores generados tras la acción de las enzimas sobre el sustrato por el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952). Se realizó a tiempo final después de una incubación de 24 horas para conocer las enzimas que presentan actividad, posteriormente se calculó la velocidad inicial de reacción de cada una de ellas como se describe a continuación.

3.5.1.2. Cuantificación de azúcares totales

Para cuantificar los azúcares totales se usó el método de ácido sulfúrico-orcinol. El reactivo ácido sulfúrico-orcinol se preparó colocando 200 mL de agua desionizada en un matraz Erlenmeyer con un agitador magnético, y lentamente se le adicionaron 800 ml de ácido sulfúrico (97%). Mientras aún está tibio se adicionó 1 g de reactivo orcinol. Una vez disuelto se almacena en un frasco ámbar. Con el reactivo listo se colocaron 250 μ L de muestra en tubos de ensayo y se mantuvieron en baño de hielo. Posteriormente se adicionó 1 mL de reactivo ácido sulfúrico-orcinol para después colocar los tubos de ensayo en un baño maría a 95°C por 5 min. Cumplido el tiempo se pasaron a un baño de hielo y se mezclaron utilizando el agitador vortex. Finalmente, los tubos son leídos a 450 nm en el espectrofotómetro.

3.5.1.3. Tiempo final de hidrólisis enzimática

En un tubo de ensayo se tomaron 2900 μ L de sustrato a 300 ppm en buffer AAANa (Ácido Acético Acetato de Sodio) (50 mM, pH 5.0) y se agregaron 100 μ L de enzima a 4000 ppm (20mg/5ml). Se preparó un tubo de ensayo control de sustrato conteniendo 2900 μ L de sustrato a 300 ppm y 100 μ L de buffer, y un tubo de ensayo control de enzima conteniendo

2900 μL de buffer y 100 μL de enzima a 4000 ppm. Los tubos se dejaron incubar durante 24 horas a una temperatura de 40°C en un baño maría. La estimación del total de azúcares reductores se realizó de acuerdo con el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952).

Para la xilanasa (*T. lanuginosus*) se prepararon soluciones de los diferentes polisacáridos a una concentración de 1000 ppm en buffer AAANa (50 mM, pH 5.0). En tubos de ensayo de 10 mL se tomaron 750 μL de sustrato y se le adicionaron 50 μL de enzima xilanasa (*T. lanuginosus*). Se prepararon tubos de control sustrato con 750 μL de sustrato y 50 μL de buffer AAANa, y de control de enzima con 750 μL de buffer AAANa y 50 μL de enzima. Los tubos se dejaron incubando a 40° C por 24 horas. La estimación del total de azúcares reductores se realizó de acuerdo con el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952).

3.5.1.4. Velocidad inicial de reacción

En un tubo de ensayo se tomaron 290 μL de sustrato a 300 ppm en solución amortiguadora de acetatos (AAANa) 50 mM, pH 5.0 y se agregaron 10 μL de enzima a 4000 ppm. Se preparó un tubo de ensayo control de sustrato conteniendo 290 μL de sustrato a 300 ppm y 10 μL de la solución amortiguadora, y un tubo de ensayo control de enzima conteniendo 290 μL de solución amortiguadora y 10 μL de enzima a 4000 ppm. Los tubos se dejaron incubar a una temperatura de 40°C en un baño maría durante 50 minutos, tomándose muestra cada 10 minutos. Para el caso de las enzimas con una alta velocidad inicial de reacción, el tiempo fue de 15 minutos tomándose muestra cada 3 minutos. La estimación del total de azúcares reductores se realizó de acuerdo con el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952).

3.6.1.5. Detección de la actividad ferúlico esterasa

En un vaso de precipitado se pesaron 15 mg de etil ferulato y se agregaron 5 ml de propilenglicol y se agitó hasta disolver. Posteriormente se aforo a 20 mL con agua

desionizada. En un tubo eppendorf se tomaron 950 μL y se agregaron 250 μL de verde de bromocresol. Posteriormente se agregaron 50 μL de enzima (xilanasa y hemicelulasa). Se preparó un tubo eppendorf de control con 950 μL de solución de etil ferulato con 50 μL de verde de bromocresol y 50 μL de agua desionizada.

3.6.1.6. Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Lowry, que consiste en un método colorimétrico que relaciona la cantidad de proteína con la intensidad de la coloración resultante formada por un complejo reactivo-proteína. Los reactivos se prepararon de la siguiente manera: el reactivo A es carbonato de sodio al 2% disuelto en hidróxido de sodio al 0.1 N, el reactivo B es Tartrato de Sodio y Potasio al 1%, el reactivo C es sulfato cúprico al 1%, finalmente el reactivo D se prepara al momento de utilizar con 48 mL de reactivo A + 1 ml de reactivo B + 1 mL de reactivo C. El reactivo de Folin-Ciocalteu se preparó en una dilución 1:1 en agua destilada, y la solución estándar de albumina sérica bovina (BSA) a 1000 ppm. Se tomaron 50 μL de muestra mezclada con 1 ml de reactivo D, la mezcla se deja reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregan 100 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se mezclan y se dejan reposar 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo las muestras se leen a 600nm en el espectrofotómetro (Lowry et al., 1951).

3.6.1.7. Hidrólisis química de arabinoxilanos de trigo

Se tomaron 2 mg de los arabinoxilanos de trigo (Megazyme) y se colocaron en tubos ensayo con tapón con rosca. Posteriormente se añadieron 500 μL de ácido trifluoroacético 4N. Los tubos se colocaron en un hidrolizador de muestras a 95°C por un tiempo 2, 4 y 6 horas. Una vez transcurrido el tiempo el ácido fue evaporado usando nitrógeno. Finalmente, las muestras fueron diluidas en 5 ml de desionizada y microfiltradas con filtros de 0.7 μm para ser analizadas por HPAEC-PAD.

3.6.1.8. Hidrólisis enzimática de arabinosilanos de trigo

Se preparó una solución de arabinosilanos de harina de trigo (Megazyme, P-WAXYM) en buffer AAANa (50mM, pH 5.0) a 2000 ppm y se micro filtró utilizando filtros de 0.45 micras. En tubos de ensayo de 10 mL se tomaron 2450 μ L de la solución de arabinosilanos y se le agregaron 50 μ L de enzima (xilanasas y hemicelulasas). Se preparó un tubo control con 2450 μ L de solución de arabinosilanos y 50 μ L de buffer AAANa (50mM, pH 5.0). Los tubos se dejaron incubar a 40°C por 48 horas. La solución final se micro filtró con filtros de 0.45 micras y se analizó por HPAEC-PAD.

3.6.1.9. Hidrólisis enzimática del pericarpio de maíz

Se preparó una solución de pericarpio de maíz en buffer AAANa (50mM, pH 5.0) a 2000 ppm. En tubos de ensayo de 10 mL se tomaron 2450 μ L de la solución de pericarpio de maíz y se le agregaron 50 μ L de enzima (xilanasas y hemicelulasas). Se preparó un tubo control con 2450 μ L de solución de pericarpio de maíz y 50 μ L de solución amortiguadora de AAANa (50mM, pH 5.0). Los tubos se dejaron incubando a 40°C por 48 horas. La solución final se micro filtró con filtros de 0.45 micras y se analizó por HPAEC-PAD.

3.6.2. Análisis bromatológico

3.6.2.1. Determinación del contenido de humedad

Para la muestra de pericarpio de maíz se utilizó 1g de muestra homogeneizada, se colocó en la estufa por un tiempo de entre 1-4 horas a una temperatura de 105°C. Transcurrido el tiempo se retiró el crisol de la estufa, y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos, para pesar de nuevo. Posteriormente el crisol se colocó nuevamente en la estufa por 30 minutos. Se retiró, dejó enfriar, y peso hasta obtener un peso constante durante 3 ocasiones. Método 44-15.02 (AACC International, 2000).

3.6.2.2. Determinación de cenizas totales

Se utilizaron 2 g de pericarpio de maíz, se calcinó utilizando un mechero hasta carbonizar. Posteriormente se incinero en una mufla a 650⁰C durante 3-4 horas, hasta la aparición de cenizas blancas. Posteriormente se retiró de la mufla y se dejó secar a temperatura ambiente para pesar. Método 08-01.01 (AACC International, 2000).

3.6.2.3. Determinación de proteínas por el método de Kjeldahl

Se utilizaron 0.5 g de pericarpio de maíz, se agregaron al tubo Kjeldahl junto con el catalizador (Tabletas Kjeldahl) y 15 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente se hizo la digestión en el equipo de digestión Kjeldahl. La solución acida se alcalinizó con solución de hidróxido de sodio al 40%. El amoniaco fue destilado y recogido en una cantidad medida de ácido bórico titulándose con una solución valorada de ácido clorhídrico. El factor de conversión utilizado fue de 6.25. Método 46-16.01 (AACC International. 2000).

3.6.2.4. Determinación de fibra cruda

Se colocaron 0.5 g de pericarpio de maíz en un vaso Berzelius con 20 mL de ácido sulfúrico al 1.25% y se colocó en el extractor de fibra cruda, dejándose hervir por 30 minutos. Posteriormente se lavó, y se agregaron 100 ml de una solución de hidróxido de sodio al 1.25% por 30 min. Posteriormente se lavó hasta eliminar el álcali y se verifico el pH. La muestra fue secada a 110⁰C y se pesó. Posteriormente se incinero en la mufla a 650⁰C, se dejó enfriar y se pesó (Norma Oficial Mexicana NOM-F-90-S-1978).

3.6.2.5. Determinación del extracto etéreo

Se utilizaron 0.5 g de pericarpio de maíz para la extracción de grasa por un reflujo de solvente por calentamiento continuo, en este caso por el método de Soxhlet. Se utilizó éter de petróleo como disolvente. Método 30-25.01 (AACC International, 2000).

3.6.3. Pretratamiento del pericarpio de maíz con propilenglicol

Los resultados obtenidos a continuación se analizaron por el método de genipina, debido a que se trata de un reactivo natural y específico para la determinación de la concentración de grupos amino libres en las muestras durante el proceso de lavado del pericarpio de maíz (Ramos-Ponce et al., 2010).

3.6.3.1. Efecto del porcentaje de propilenglicol

Se colocaron 100 mg de pericarpio de maíz con 20 mL de propilenglicol a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75, 100 % respectivamente) en agua destilada, y se dejaron en agitación a 250 rpm por 18 horas. Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante por decantación. Las muestras se analizaron por el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010) y leídas en el espectrofotómetro a 589 nm.

3.6.3.2. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz

Se colocó el pericarpio de maíz a diferentes concentraciones (100, 200, 400, 800, 1600, 3200 mg) en 20 mL de propilenglicol/agua (1:1) y se dejó en agitación a 250 rpm por 18 horas. Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante por decantación. Las muestras se analizaron por el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010) y leídas en el espectrofotómetro a 589 nm.

3.6.3.3. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado

El volumen de propilenglicol fue recuperado después del lavado por 18 horas en un agitador orbital a 250 rpm en relación con la concentración de pericarpio de maíz. Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante por

decantación. Las muestras se analizaron por el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010) y leídas en el espectrofotómetro a 589 nm.

3.6.3.4. Efecto del tiempo de lavado del pericarpio de maíz

Se colocaron 800 mg de pericarpio de maíz con 20 mL de propilenglicol/agua (1:1) y se dejaron lavando en un agitador orbital a 250 rpm por diferentes tiempos (10, 20, 30, 40, 50, 60, 180, 540 y 1080 min). Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante por decantación. Las muestras se analizaron por el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010) y leídas en el espectrofotómetro a 589 nm.

3.6.3.5. Efecto del número de lavados del pericarpio de maíz

Se colocaron 800 mg de pericarpio de maíz y se realizaron 5 lavados consecutivos, cada uno con propilenglicol/agua (1:1) en un agitador orbital por 20 minutos a 250 rpm. Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante por decantación. Las muestras se analizaron por el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010).

3.6.3.6. Cuantificación de zeína

Para la cuantificación de zeína se preparó un estándar de zeína (Sigma-Aldrich) a 20000 ppm, del cual se tomaron 400 μ L y se agregaron 1600 μ L de propilenglicol/agua (1:1), 1900 μ L de buffer de boratos (50 mM, pH 7.0) y 100 μ L de endoproteasa (Megazyme). Se colocaron en la incubadora a 40°C y se dejaron reaccionar durante 24 horas. A partir de este hidrolizado se preparó una curva de calibración de zeína y se analizó por el método de genipina.

3.6.4. Ensayos enzimáticos del pericarpio de maíz

En tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 20 mg de pericarpio de maíz lavado con agua y con propilenglicol/agua (1:1). Posteriormente se adicionaron 990 μ L de solución

amortiguadora de AAANA (50mM, pH 5.0) y se adicionaron 10 μ L de enzima xilanasas y hemicelulasas a 1000 ppm respectivamente. Adicionalmente se prepararon tubos eppendorf como controles de enzima y de sustrato, en el caso del control de enzima se agregaron 990 μ L de buffer AAANA (50mM, pH 5.0) y 10 μ L de enzima, y para el control sustrato se agregaron 20 mg de pericarpio de maíz en 1000 μ L de buffer AAANA (50mM, pH 5.0). Finalmente los tubos se colocaron en un agitador orbital a 250 rpm y 40°C. Las muestras fueron tomadas a diferentes tiempos (0.5, 1, 3, 6, 12, 24, 72, 120 horas), centrifugadas a 10000 rpm por 10 min y el sobrenadante se analizó por el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) para cuantificar azúcares reductores.

3.6.5. Cavitación hidrodinámica

Para las pruebas con la cavitación hidrodinámica se utilizaron 100 g de pericarpio de maíz en 4 litros de agua, y se establecieron dos tiempos de proceso uno de 15 min y otro de 60 min. El material recuperado se dejó sedimentar para recuperar el pericarpio de maíz por decantación, y se dejó secar en una estufa a 60°C por 24 horas para los siguientes análisis. Posteriormente se tomaron 800 mg de pericarpio de maíz y se realizaron 3 lavados consecutivos, cada uno con propilenglicol/agua (1:1) por 20 minutos a 250 rpm. Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante por decantación y se analizó por el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010). El sedimento se dejó secar en una estufa a 60°C por 24 horas para los posteriores ensayos enzimáticos.

3.6.6. Efecto de la cavitación hidrodinámica en la liberación de proteína con respecto al número de lavados

En matraces Erlenmeyer se colocaron 800 mg de pericarpio de maíz de los distintos tratamientos y se realizaron 3 lavados consecutivos, cada uno con propilenglicol/agua (1:1) por 20 minutos a 250 rpm. Posteriormente se centrifugaron a 8000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante por decantación. Las muestras se analizaron por el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010).

En este experimento se utilizó un diseño factorial 3^2 , donde uno de los factores fue el tiempo de HC (0, 15 y 60 minutos), el otro factor fue el número de lavados (primero, segundo y tercer lavado), con la finalidad de evaluar la cantidad de proteína extraída.

3.6.7. Tratamiento enzimático del pericarpio de maíz después de la cavitación hidrodinámica

En matraces Erlenmeyer se colocaron 500 mg de pericarpio de maíz de los distintos tratamientos (HC 15 min., HC 60 min., sin HC) y se agregaron 24.75 mL de solución amortiguadora de AAANa (Ácido Acético Acetato de Sodio) (50 mM, pH 5.0). Posteriormente se agregaron 250 μ L de hemicelulasa (1000 ppm). Los matraces se colocaron en un agitador orbital a 250 rpm y 40°C durante 12 horas. Los hidrolizados resultantes se analizaron por el método ácido sulfúrico-orcinol y el método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1952) para cuantificar azúcares totales y azúcares reductores respectivamente.

Se utilizó un diseño factorial, donde uno de los factores fue el tiempo de cavitación con 3 niveles (0, 15 y 60 minutos), y el otro factor la enzima con dos niveles (sin enzima y con enzima), para evaluar la cantidad de azúcares liberados.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis bromatológico del pericarpio de maíz

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis bromatológico del pericarpio de maíz troceado Zean Bran C75 proporcionado por Industrias Centli, S. A. de C. V. (Figura 8). Podemos observar que el pericarpio de maíz se caracteriza por un alto contenido de fibra, lugar donde se encuentran los arabinosilanos ya que son los principales polisacáridos no amiláceos de los granos de los cereales.

Tabla 3. Análisis bromatológico del pericarpio de maíz.

Contenido	Pericarpio (%)	Maíz
Humedad	6.2683 ± 0.1216	10.082 ± 0.2152
Cenizas totales	1.3465 ± 0.1920	1.3202 ± 0.0192
Proteína	6.6494 ± 0.0038	7.4582 ± 0.0231
Fibra cruda	46.6715 ± 4.5204	1.7154 ± 0.0824
Grasa cruda	8.4364 ± 0.1365	

En el caso del análisis de fibra cruda podemos observar una mayor variación en los resultados. Lo anterior puede ser explicado de acuerdo con la solubilidad de la fibra, un porcentaje de fibra soluble (pectinas, gomas, mucílagos, ciertas hemicelulosas, polisacáridos de algas y celulosa modificada) se pierde durante el tratamiento con ácido sulfúrico y con hidróxido de sodio, quedando en su mayoría fibra insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina) por lo que hay una subestimación del contenido de fibra (Moron et al., 1997).

4.2. Pretratamiento del pericarpio de maíz con propilenglicol

Debido a las dificultades presentadas para la hidrólisis del pericarpio de maíz por el tratamiento enzimático, se decidió implementar un pretratamiento de lavado. Lo anterior con la finalidad de extraer la proteína (principalmente zeína) presente en el material que impedía la acción de las enzimas.

4.2.1. Efecto del porcentaje de propilenglicol

Se decidió utilizar el propilenglicol debido a su menor costo comparado con los solventes tradicionales (etanol, propanol, mercaptoetanol, etc.), utilizados en la extracción de proteínas (Esen, 1986; Mannheim y Cheryan, 1993), y se trata de un compuesto “generalmente considerado como seguro” (GRAS) por la FDA (Food and Drug Administration).

En la Figura 10 se observa el efecto del porcentaje de propilenglicol en relación con la proteína extraída, y se observa que la mayor cantidad de proteína se extrae con un porcentaje del 50% de propilenglicol en agua destilada.

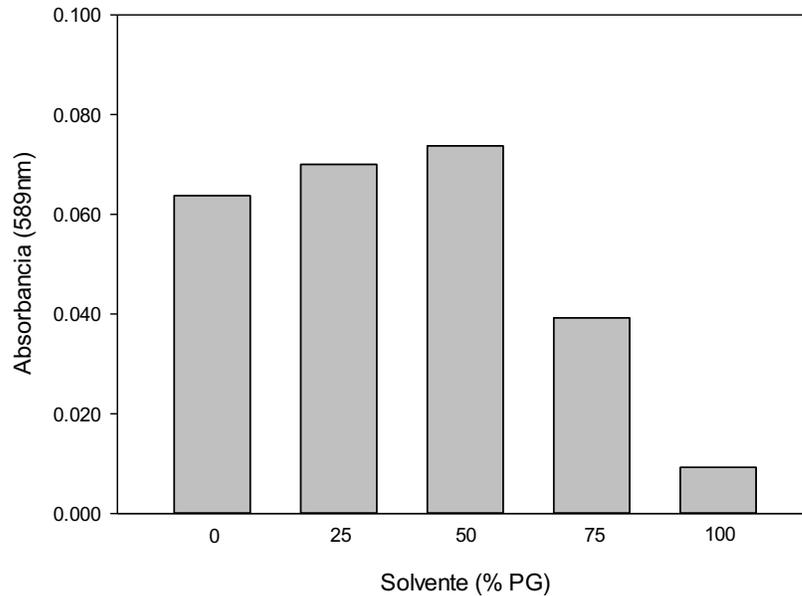


Figura 10. Efecto del porcentaje de propilenglicol en relación a la proteína extraída.

Tabla 4. ANOVA del efecto del porcentaje de propilenglicol en relación a la proteína extraída.

Respuesta: Absorbancia						
	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.	
Solvente (PG)	4	0.011688	2.922e-03	64.743	2.791e-09	***
Residuales	15	0.000677	4.513e-05			

Significancia:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*' 0.05
						'.' 0.1 ' ' 1

En la Tabla 4 se presenta los resultados del ANOVA de una vía para evaluar la significancia del efecto del porcentaje de propilenglicol en relación con la cantidad de proteína extraída. Con un P-valor < 0.05 podemos decir que el porcentaje de propilenglicol es un factor significativo en la extracción de proteína del pericarpio de maíz.

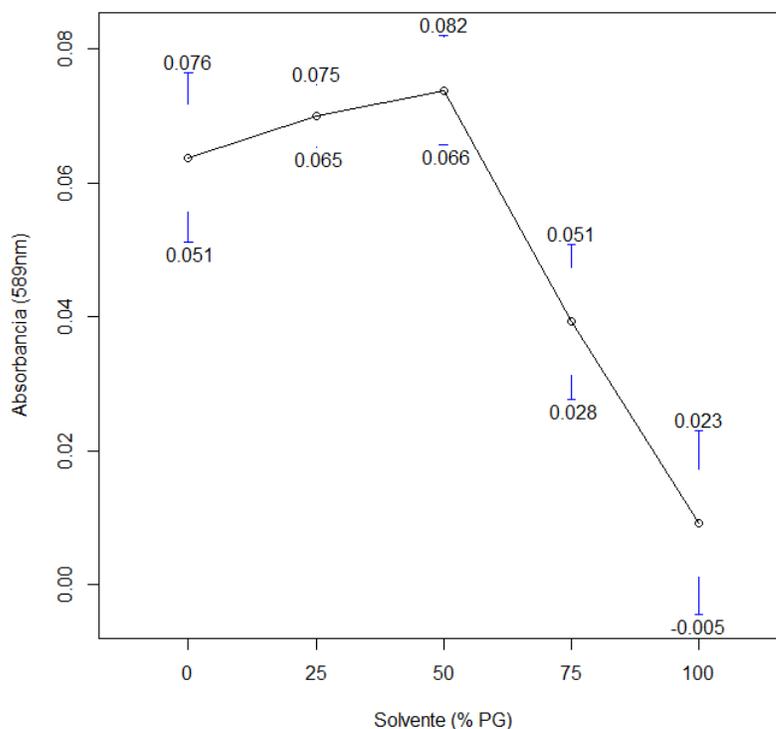


Figura 11. Intervalos de confianza al 95% para el efecto del porcentaje de propilenglicol en relación a la proteína extraída.

Para demostrar el efecto del porcentaje de propilenglicol en la extracción de proteína se realizó una gráfica de intervalos de confianza. En la Figura 11 se observa que no hay una diferencia significativa entre el 0, 25 y 50% de propilenglicol, esto puede ser explicado de acuerdo con las diferencias en la solubilidad de las proteínas del grano de maíz y que se encuentren en el pericarpio de maíz. Las albuminas y algunas globulinas pueden ser extraídas en presencia de agua debido a pequeñas cantidades de sal en el pericarpio, por el contrario, las zeínas son solubles solo en presencia de alcoholes y soluciones alcalinas con pH mayor a 11.5, por lo tanto se decidió utilizar la mezcla con 50% de propilenglicol para extraer la mayor cantidad de proteínas (Wall, J.S. , Paulis, 1978).

Es importante destacar que, aunque se observa que la cantidad de proteína extraída disminuye después del 50% de propilenglicol (diferencia significativa al 75% y 100% de propilenglicol), puede ser debido a la pérdida de la capacidad de la genipina para formar el complejo de color azul, debido a la pérdida de la actividad acuosa por la saturación de propilenglicol.

Con base en lo anterior, los resultados obtenidos (Figura 11) se decidió utilizar una concentración 1:1 de propilenglicol/agua, ya que, aunque se observa que no hay diferencia significativa comparado con 0 y 25% esto puede deberse a una saturación de la solución o presencia de proteínas solubles en agua.

4.2.2. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz

Se realizó la evaluación de la cantidad de proteína extraída dependiendo de la cantidad de pericarpio de maíz. En la Figura 12 observamos en el eje “x” las concentraciones de pericarpio de maíz y en el eje “y” la absorbancia leída a 589 nm. Podemos resaltar que a medida que aumenta la cantidad de pericarpio de maíz aumenta la concentración de proteína extraída manteniendo constante la cantidad de propilenglicol/agua utilizada para lavar (20 mL).

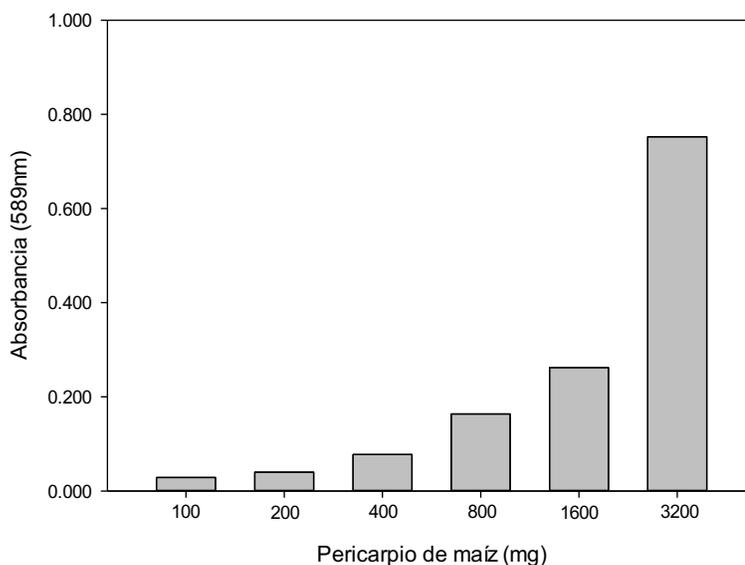


Figura 12. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación a la proteína extraída.

Tabla 5. ANOVA del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz.

Respuesta: Absorbancia (589nm)						
	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.	
Pericarpio (mg)	5	1.51011	0.302021	188.18	6.959e-15	***
Residuales	18	0.02889	0.001605			

Significancia:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'
				0.05	'.'	0.1
					' '	1

En la Tabla 5 se presenta los resultados del ANOVA de una vía para evaluar la significancia del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación a la cantidad de proteína extraída. Con un P-valor < 0.05 podemos decir que la concentración de pericarpio de maíz es un factor significativo en la extracción de proteína del pericarpio de maíz.

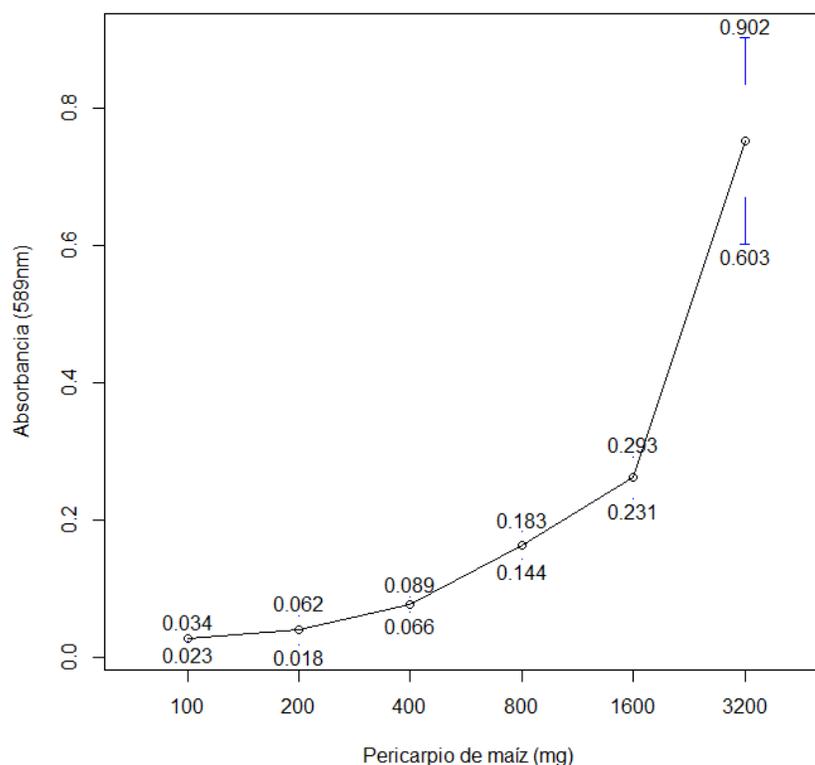


Figura 13. Intervalos de confianza al 95% del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz.

Posteriormente se realizó una gráfica de los intervalos de confianza, para evaluar la significancia de la cantidad de pericarpio de maíz en la extracción de proteína. En la Figura 13 se muestran los resultados obtenidos, en el eje “x” la concentración de pericarpio de maíz, en el eje “y” la absorbancia leída a 589 nm.

La cantidad de proteína extraída aumenta significativamente en relación a la cantidad de pericarpio de maíz, es decir, existe proteína (zeína) remanente en el pericarpio de maíz que puede impedir la acción de las enzimas, y que puede ser extraída utilizando el propilenglicol. Siendo de gran interés debido a su valor comercial y sus posibles aplicaciones en el campo de los cereales.

Es importante destacar que trabajar con concentraciones altas de pericarpio puede enmascarar el rendimiento de proteína extraída debido a una saturación de la solución y pérdida de la capacidad de solubilizar la zeína. Además, existe un hinchamiento del pericarpio por absorción de la solución, lo que en métodos prácticos se traduce en un mayor tiempo de secado del material. Por lo que se decidió utilizar 800 mg de pericarpio de maíz para el pretratamiento de lavado.

4.2.3. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado

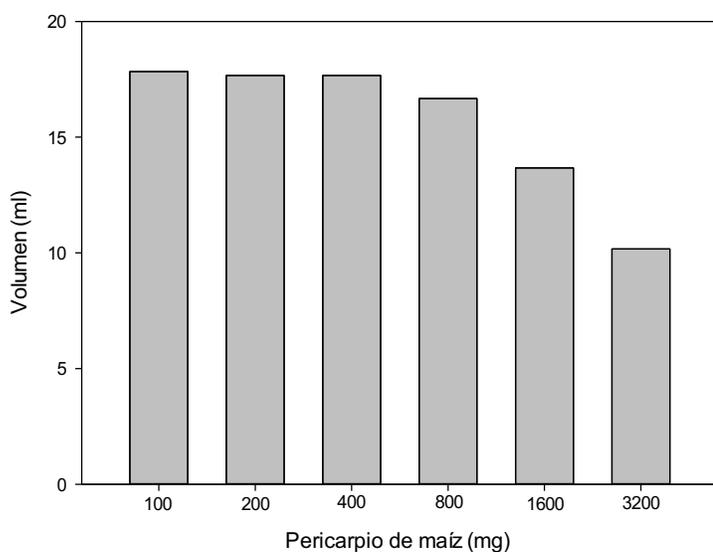


Figura 14. Efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado.

Con relación al análisis de cantidad de pericarpio de maíz se evaluó el volumen del sobrenadante recuperado, esto con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de líquido, evitando que se quede absorbido en el material. En la Figura 14 se presenta la gráfica con los mL de propilenglicol/agua, en el eje “x” la concentración de pericarpio de maíz en miligramos (mg), y en el eje “y” el volumen de propilenglicol/agua recuperado en ml. Podemos observar que después de los 1600 mg una mayor cantidad de propilenglicol/agua queda absorbido en el material.

Tabla 6. ANOVA del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado.

Respuesta: Volumen (ml)

	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.
Pericarpio (mg)	5	143.78	28.7556	138.03	3.574e-10 ***
Residuales	12	2.50	0.2083		

 Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En la Tabla 6 se presenta los resultados del ANOVA de una vía para evaluar la significancia del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol/agua recuperado. Con un P-valor < 0.05 podemos decir que la concentración de pericarpio de maíz es un factor significativo en la recuperación del propilenglicol/agua donde se encuentra disuelta la proteína.

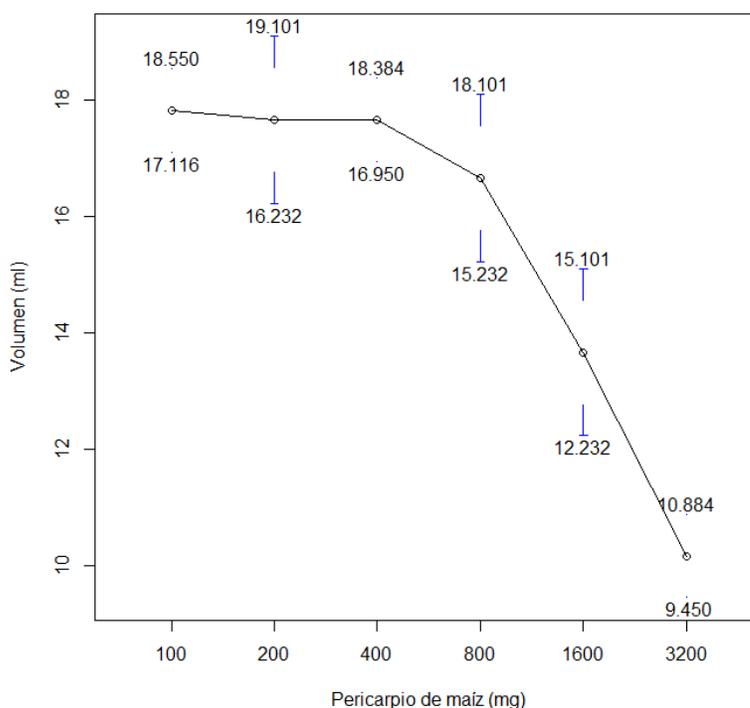


Figura 15. Intervalos de confianza al 95% del efecto de la cantidad de pericarpio de maíz en relación al volumen de propilenglicol recuperado.

En la Figura 15 se muestra una gráfica de intervalos de confianza evaluando la significancia de la cantidad de pericarpio de maíz, con relación al volumen de propilenglicol/agua recuperado. Podemos observar que entre las primeras cuatro concentraciones (100, 200, 400 y 800 mg) no existe una diferencia significativa, es a partir

de los 1600 mg donde se presenta una diferencia significativa. Esto debido a que ya existe una saturación de la solución por el material, lo que dificulta la extracción y retarda el proceso de secado. Por lo tanto, la concentración seleccionada de pericarpio de maíz, durante el pretratamiento de lavado es de 800 mg.

4.2.4. Efecto del tiempo de lavado del pericarpio de maíz

En este apartado se evaluó la liberación de proteína durante el proceso de lavado de 18 horas. En la Figura 16 se presenta la gráfica donde el eje “x” representa el tiempo en minutos de lavado, y el eje “y” la absorbancia en 589 nm. Podemos observar que la cantidad de proteína aumenta a medida que aumenta el tiempo de lavado. Aunque industrialmente un proceso de lavado tan largo no es rentable, por lo que se decidió evaluar un proceso con lavados consecutivos que disminuyera el tiempo del proceso.

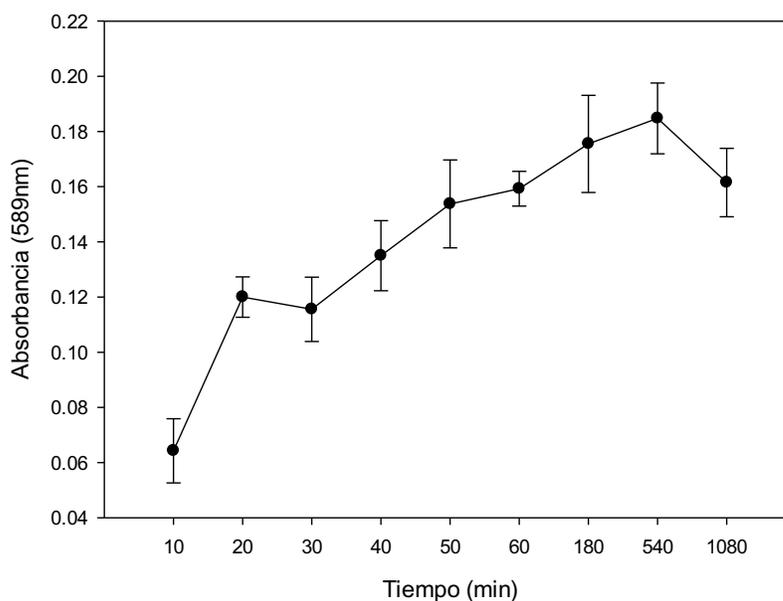


Figura 16. Efecto del tiempo de lavado del pericarpio de maíz en relación con la proteína extraída.

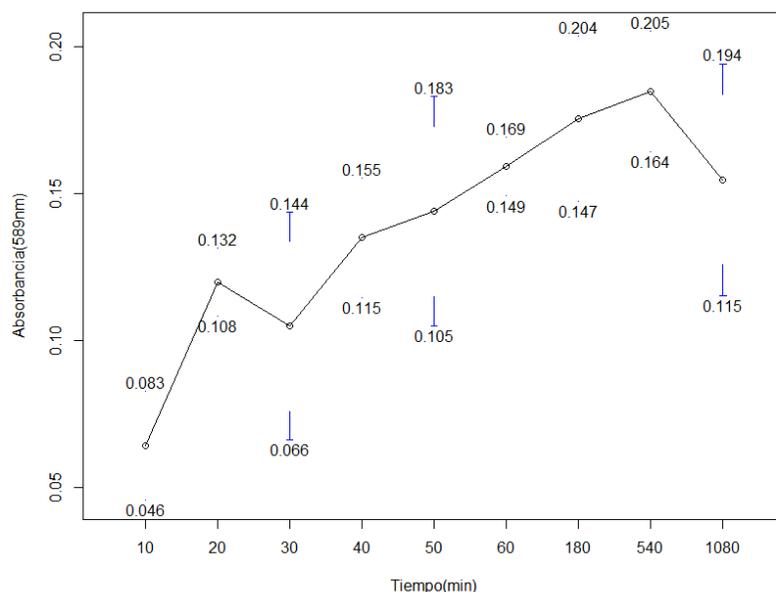


Figura 17. Intervalos de confianza al 95% del efecto del tiempo en la cantidad de proteína extraída.

De acuerdo con los intervalos de confianza de la Figura 17 podemos observar que no hay diferencia significativa en la extracción de proteína con respecto al tiempo, por lo que decidimos utilizar lavados de 20 minutos para los experimentos posteriores, ya que esto minimiza el tiempo de procesamiento.

4.2.5. Efecto del número de lavados del pericarpio de maíz

Debido a que un pretratamiento de lavado con un tiempo de lavado prolongado no es rentable industrialmente, se decidió evaluar la cantidad de proteína liberada realizando una serie de lavados consecutivos.

En la Figura 18 se muestran los resultados obtenidos, en el eje “x” el número de lavado, y en el eje “y” la absorbancia leída a 589 nm. Podemos observar que los lavados donde se extrae la mayor cantidad de proteína son los primeros tres.

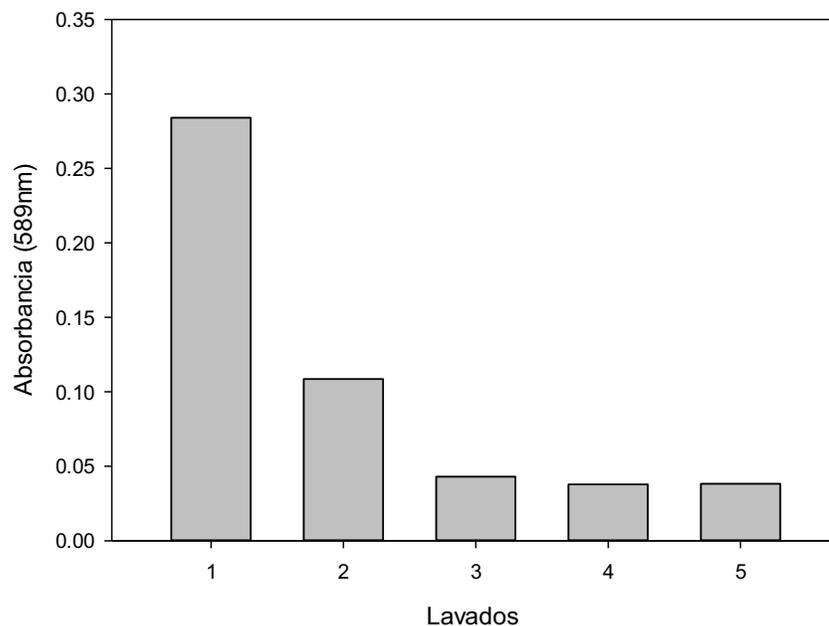


Figura 18. Efecto del número de lavados del pericarpio de maíz en relación a la cantidad de proteína extraída.

Tabla 7. ANOVA del efecto del número de lavados del pericarpio de maíz en relación a la cantidad de proteína extraída.

Respuesta: Absorbancia (589nm)

	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.
Número de lavados	4	0.179356	0.044839	180.68	1.71e-12 ***
Residuales	15	0.003722	0.000248		

 Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En la Tabla 7 se presenta los resultados del ANOVA de una vía para evaluar la significancia del efecto del número de lavados con propilenglicol en relación a la cantidad de proteína extraída. Con un P-valor < 0.05 podemos decir que el número de lavados es un factor significativo en el proceso de extracción de proteína del pericarpio de maíz.

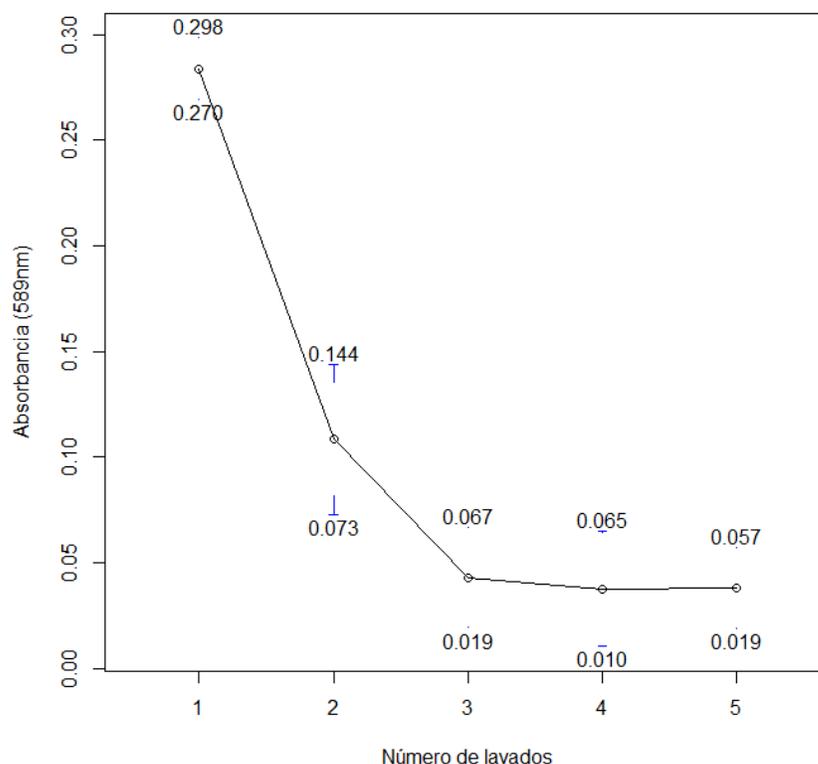


Figura 19. Intervalos de confianza al 95% del efecto del número de lavados del pericarpio de maíz en relación a la cantidad de proteína extraída.

Finalmente, en la Figura 19 se muestra una gráfica de intervalos de confianza, donde el eje “x” representa el número de lavados, y el eje “y” la absorbancia leída a 589 nm. Se observa claramente que es durante los primeros tres lavados donde existe una diferencia significativa, y por lo tanto donde se extrae la mayor cantidad de proteína del pericarpio de maíz. Después del tercer lavado no existe una diferencia significativa.

Por lo tanto, a partir de los resultados anteriores se estableció que con tres lavados consecutivos de propilenglicol/agua, podemos asegurarnos que extrajimos la mayor cantidad de proteína (zeína) presente en el pericarpio de maíz.

Con base en los resultados obtenidos anteriormente, se estableció que las mejores condiciones para el pretratamiento de lavado fueron utilizar 800 mg de pericarpio de maíz y realizar tres lavados de 20 minutos con 20 mL de propilenglicol/agua (1:1), en un agitador orbital a 250 rpm para extraer la mayor cantidad de zeína.

4.2.6. Cuantificación de zeína

Debido a las dificultades que existen para cuantificar la zeína por su solubilidad en solventes orgánicos (principalmente alcoholes), se desarrolló un método alternativo que nos permitió cuantificar la zeína extraída del pericarpio de maíz. Algunos de los métodos reportados se basan en análisis turbidimétricos de las soluciones de zeína (Larson y Hoffman, 2008; Giuberti et al., 2012), por lo que se propuso un nuevo método utilizando una endo-proteasa para hidrolizar la zeína, y que favoreció la reacción con la genipina.

En la Figura 20 se muestra la hidrólisis de la zeína por acción de la endo-proteasa. En el tubo A la zeína forma una solución turbia debido a la concentración (2000 ppm) y a su poca solubilidad en el medio; en el tubo B se observa como la zeína es hidrolizada después de 24 horas de reacción, mejorando la solubilidad.

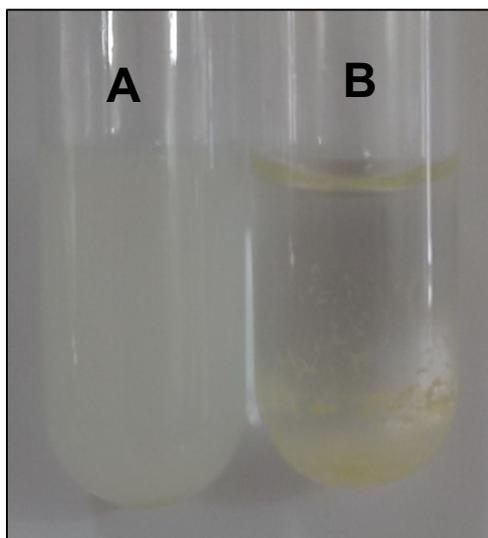


Figura 20. Hidrólisis de la zeína por acción de la endo-proteasa. A) Zeína disuelta en propilenglicol/agua/buffer de boratos. B) Zeína disuelta en propilenglicol/agua/buffer de boratos hidrolizada por acción de la endo-proteasa.

Al hidrolizar la zeína los grupos amino quedan libres, permitiendo la formación del complejo genipina-amino libre, dando como resultado la coloración azul. En la Figura 21 se muestran los resultados del análisis después de la reacción con lo genipina. En el tubo de ensayo A se observa la zeína hidrolizada con la endo-proteasa después de reaccionar con la

genipina, en el tubo de ensayo B un control en ausencia de zeína, y en el tubo de ensayo C la zeína sin hidrolizar después de reaccionar con la genipina.

Si comparamos el tubo A y el tubo C, se observa claramente que al hidrolizar la zeína se mejora la solubilidad y la formación del complejo colorimétrico, es decir, se favorece la reacción con la genipina. Esto permitió realizar un estándar de zeína basado en este principio, para establecer una curva de calibración de zeína y cuantificar la zeína extraída del pericarpio de maíz.

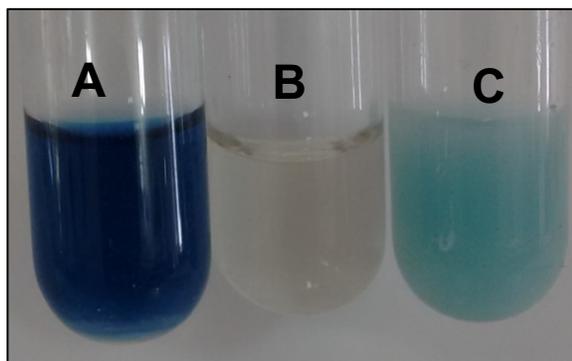


Figura 21. Cuantificación de zeína por el método de genipina. A) Zeína hidrolizada con la endoproteasa. B) Control en ausencia de zeína. C) Zeína sin hidrolizar.

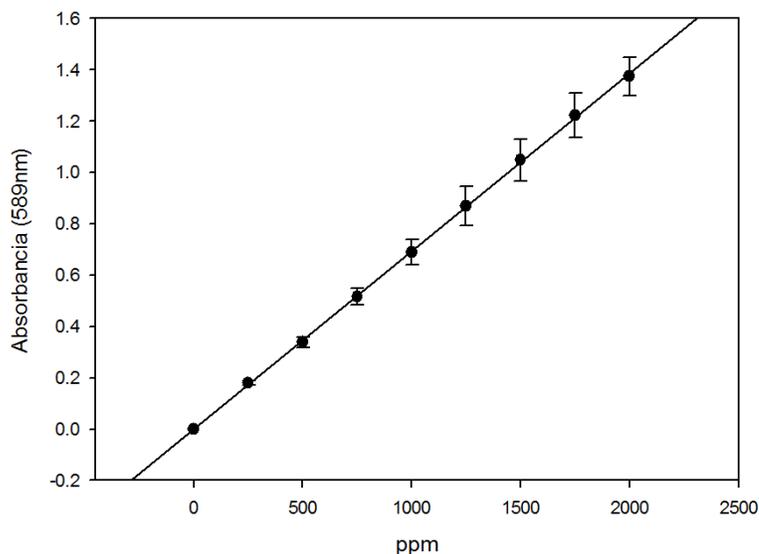


Figura 22. Curva de calibración de zeína.

En la Figura 22 se muestra la curva de calibración de zeína, el eje “x” representa la concentración de zeína en ppm, el eje “y” representa la absorbancia leída a 589 nm en un

espectrofotómetro, como se describe en el método de genipina (Ramos-Ponce et al., 2010). Esto nos permitió relacionar la concentración de zeína con la absorbancia mediante la Ecuación 2 para obtener una estimación de la cantidad de zeína extraída mediante los lavados del pericarpio de maíz.

$$y = 0.0069x - 0.0003$$

$$R^2 = 0.9998$$

Ecuación 1. Regresión lineal obtenida de la curva de calibración de zeína.

A continuación, se presenta una tabla con la estimación de la cantidad de zeína extraída mediante los lavados consecutivos con propilenglicol/agua.

Tabla 8. Cuantificación de zeína extraída con propilenglicol/agua con respecto al número de lavados.

Lavado	mg de zeína/ 100 mg de pericarpio
1	1.6814 ± 0.1360
2	0.5957 ± 0.0796
3	0.3617 ± 0.0532
4	0.3430 ± 0.0613
5	0.3448 ± 0.0430

Esta tabla nos demuestra que es durante los primeros tres lavados es donde se extrae la mayor cantidad de zeína presente en el pericarpio de maíz.

Tabla 9. ANOVA de la cantidad de zeína extraída con respecto al número de lavados con propilenglicol/agua.

Respuesta: mg de zeína/100 mg de pericarpio											
	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.						
Número de lavados	4	5.3442	1.33604	200.79	7.884e-13 ***						
Residuales	15	0.0998	0.00665								

Significancia:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'	0.05	'.'	0.1	' '	1

En la Tabla 9 se presenta los resultados del ANOVA de una vía para evaluar la significancia del efecto del número de lavados con propilenglicol en relación a los mg de

zeína extraída por cada 100 mg de pericarpio de maíz. Con un P-valor < 0.05 , podemos decir que el número de lavados es un factor significativo en el proceso de extracción de proteína del pericarpio de maíz. Además a partir del tercer lavado no hay diferencia significativa como se observa en la gráfica de los intervalos de confianza de la Figura 23.

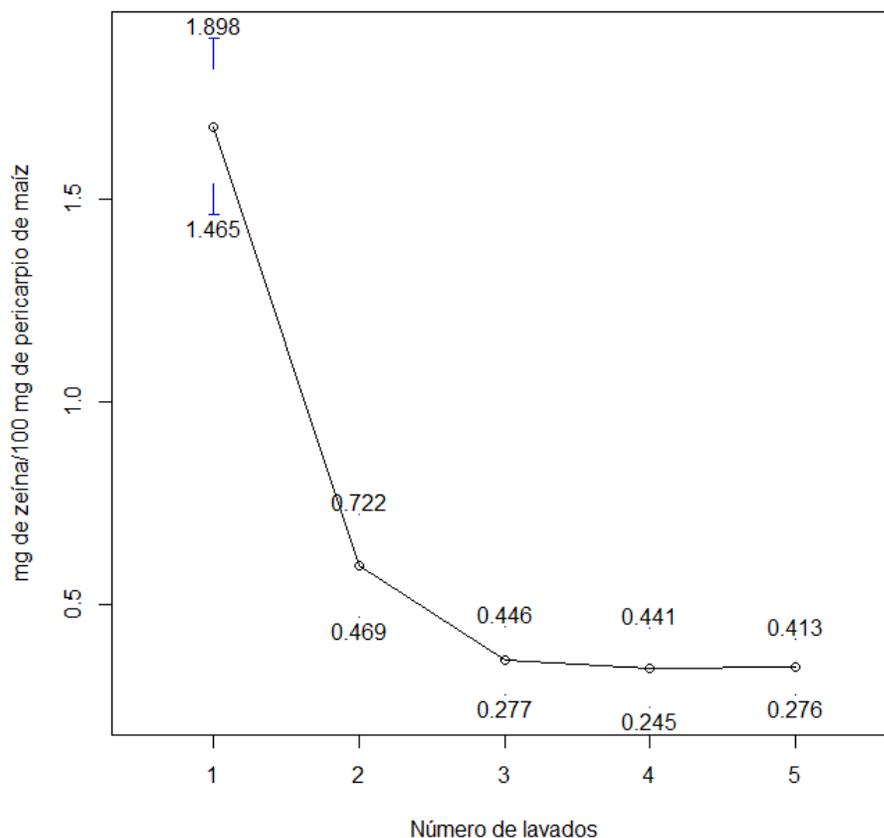


Figura 23. Intervalos de confianza al 95% de la cantidad de zeína extraída con respecto al número de lavados con propilenglicol/agua.

4.3. Selección de la enzima

4.3.1. Xilanasas de *Thermomyces lanuginosus*

Además de las enzimas previamente evaluadas, se seleccionó un extracto enzimático de mayor pureza, y que no presentará actividad feruloil esterasa. Lo anterior con la finalidad de mantener los ácidos ferúlicos unidos a la cadena principal de xilano (Figura 1) (arabinoxilanos ferulados). En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos a tiempo

final para la xilanasa (*T. lanuginosus*) sobre los diferentes sustratos analizados. En ella podemos observar que se trata de un extracto bastante puro con la capacidad de hidrolizar únicamente el xilano y el arabinoxilano, de entre todos los polisacáridos evaluados. Por esta razón se decidió utilizar en el presente estudio.

Tabla 10. Caracterización de las actividades enzimáticas de la xilanasa (*T. lanuginosus*).

Polisacárido	Actividad Enzimática
Celulosa	-
Fucoidano	-
Galactano péctico	-
Arabinano	-
Ramnogalacturonano	-
Ácido poligalacturónico	-
Arabinoxilano	+
Pectina	-
CMC	-
Xilano	++
Agavina	-
Inulina	-
Xiloglucano	-
Dextrano	-
Quitosan	-
Quitina	-
Almidón	-

Actividad enzimática: - no detectada, + baja, ++ media, +++ alta.

4.3.2. Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se hizo de acuerdo con el método de (Lowry et al., 1951) y leído en el espectrofotómetro a 600 nm.

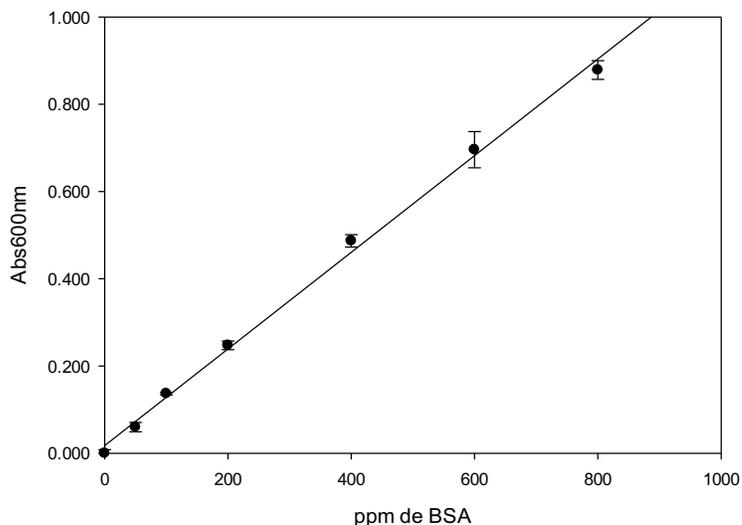


Figura 24. Curva de calibración de proteína.

En el eje “x” se observa la concentración en ppm de BSA y en el eje “y” se observa la absorbancia en nanómetros. Esto nos permite relacionar la concentración de proteína con la absorbancia mediante la Ecuación 1, para obtener una estimación de la cantidad de proteína presente en nuestras muestras analizadas.

$$y = 0.0011x + 0.0176$$

$$R^2 = 0.9969$$

Ecuación 2. Regresión lineal para la curva de calibración de proteína.

En este caso se estimó la cantidad de proteína presente en la xilanasa obteniéndose un resultado de 14.0727 mg de proteína/ 100 mg de polvo.

4.3.3. Detección de la actividad ferúlico esterasa

En la Figura 25 se observa que aquellos extractos enzimáticos capaces de hidrolizar los enlaces éster presentes en el etil ferulato permiten la liberación del ácido ferúlico, dando como resultado una disminución del pH en el medio. Por lo tanto, al estar en contacto con un indicador como el verde de bromocresol se observa un cambio de color del azul hacia el amarillo.



Xilanasas Hemicelulasa Control

Figura 25. Detección de la actividad ferúlico esterasa.

Se sabe que los arabinosilanos se encuentran principalmente en las paredes celulares del endospermo, en la aleurona y en el pericarpio de los granos de cereales. Es el contenido de ácido ferúlico el que dependerá de la fuente o la fibra de maíz, y esto a su vez estará relacionado con la degradabilidad del material y su resistencia a los insectos (Ayala-Soto et al., 2014).

4.3.4. Análisis de la actividad enzimática de diferentes extractos enzimáticos

Tabla 11. Análisis de las actividades enzimáticas.

Extracto enzimático	Xilano	PG	RG	CMC	CMC viscosímetro	FE	PNFG	Ara
Naranginase	-	-	-	+	+	-	-	-
Acid Protease II	-	-	-	-	+	-	+	-
Protease M	+++	+	+/-	-	++	+	+++	-
Pectolyase	-	-	+	+/-	+	-	+	+
Tannase KTFH	+/-	-	-	-	-	-	+++	+
Macerozyme	++	-	-	+/-	+	-	+++	+
Onozuka	++	-	-	-	+++	-	++	-
Hemicelulase	+	+	-	-	+++	+	+++	+
Lacase	*	-	-	-	-	+	*	-
Veron 191	++	*	*	*	*	+	*	*

Sustratos: xilano; PG: galactano péctico; RG: ramnogalacturonano; CMC: carboximetil celulosa; FE: Etil ferulato; PNFG: 2-nitrofenol-β-D-glucopiranosido; Ara: Arabinano.

Actividad enzimática: - no detectada; +/- baja; + media; ++ alta; +++ muy alta; * no analizada.

La actividad enzimática de los diferentes extractos enzimáticos fue evaluada a tiempo final con los sustratos correspondientes. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos.

Se seleccionaron 10 extractos enzimáticos para evaluar su capacidad de degradar diferentes sustratos, siendo los de mayor interés para este estudio el xilano, el arabinano y el etil ferulato. Con base en los resultados obtenidos se decidió utilizar la hemicelulasa, ya que se demostró que presenta una buena actividad xilanasa, arabinasa y feruloil esterasa.

Esta actividad enzimática xilanasa y feruloil esterasa es de suma importancia, ya que hay evidencias que demuestran que funcionan sinérgicamente en la degradación de los polisacáridos de la pared celular, y en la liberación del ácido ferúlico y p-coumárico (Borneman et al., 1990).

4.3.5. Hidrólisis química de arabinoxilanos de trigo

Para obtener un perfil de comparación con los productos extraídos del pericarpio de maíz, se utilizó un estándar comercial de arabinoxilanos de harina de trigo con una alta pureza (~95% en base seca). En la Figura 26 se observa el cromatograma obtenido por el HPAEC-PAD, donde podemos observar a los arabinoxilanos de harina de trigo a diferentes tiempos de hidrólisis.

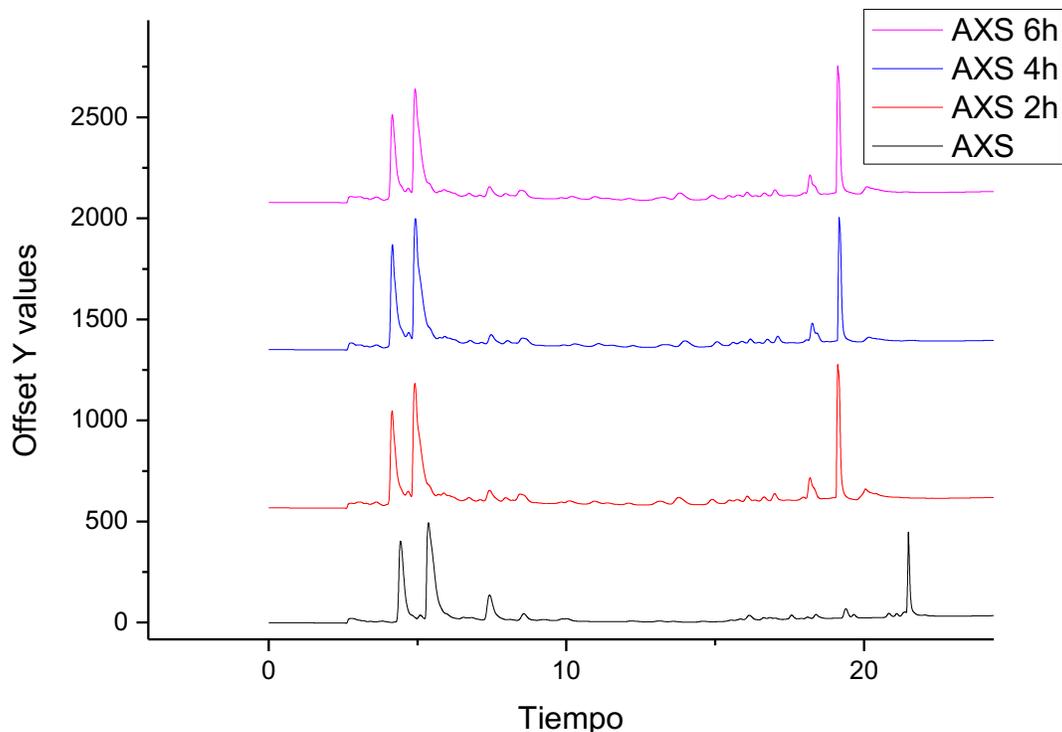


Figura 26. Cromatograma de la hidrólisis química a diferentes tiempos de los arabinosilanos de harina trigo.

Podemos observar que no hay una diferencia significativa en cuanto al tiempo de hidrólisis mayor a 2 horas. Con este experimento podemos comparar la hidrólisis química que requiere el uso del ácido trifluoroacético que es altamente corrosivo y tóxico, con un método ecológico utilizando enzimas.

4.3.6. Hidrólisis enzimática de arabinosilanos de trigo

De acuerdo con lo descrito anteriormente se decidió utilizar la hemicelulasa y la xilanasa. En la Figura 27 se observa el resultado de la hidrólisis enzimática del pericarpio de maíz, analizado por HPAEC-PAD. En ella observamos los arabinosilanos de harina de trigo hidrolizados por la xilanasa (AXS + Xyl) y la hemicelulasa (AXS + Hemi), y un control (Ctrl + AXS), es decir, sin presencia de enzima. Se observa una mejor hidrólisis por parte de la hemicelulasa, y esto puede deberse a la actividad feruloil esterasa, lo que permite romper las uniones entre los ácidos ferúlicos y mejorar la degradación del material.

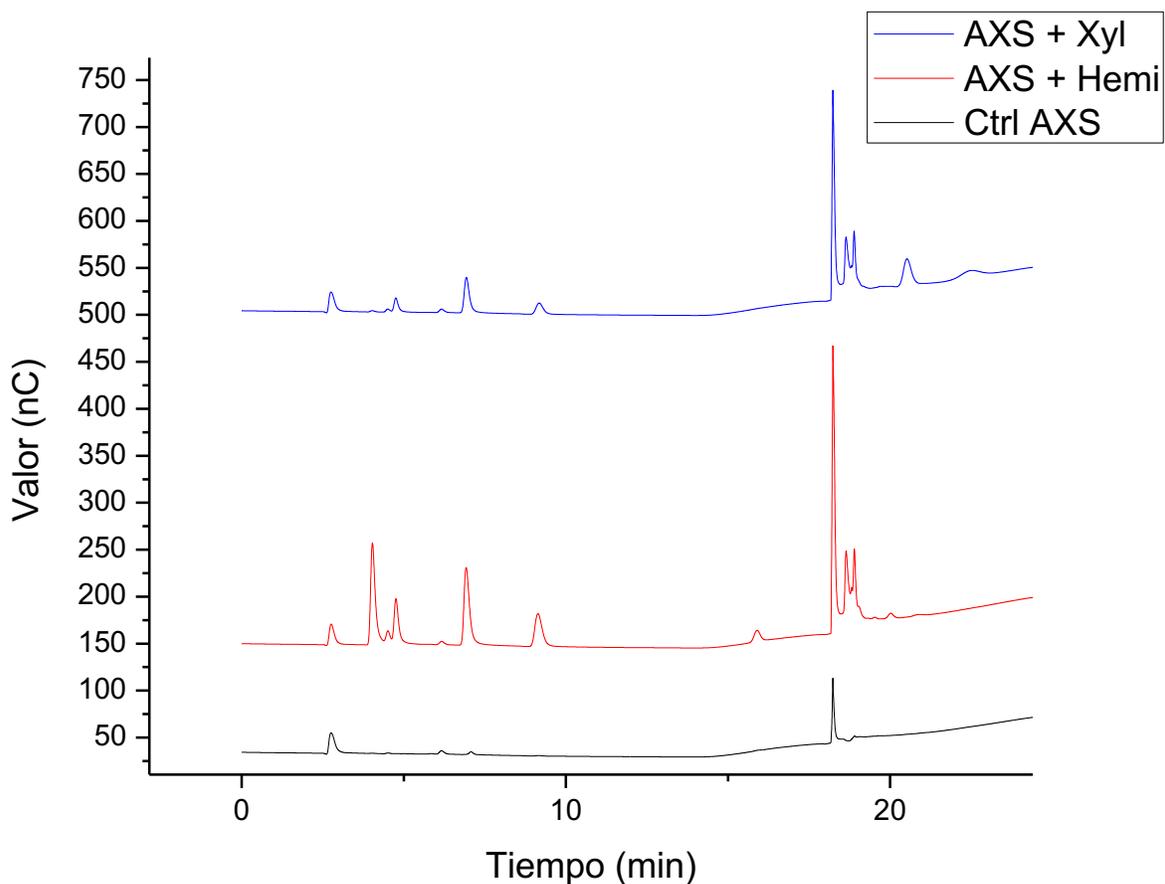


Figura 27. Cromatograma de la hidrólisis enzimática de los arabinosilanos de harina trigo.

Claramente se demuestra que la hemicelulasa es mejor en la hidrólisis de los arabinosilanos de harina de trigo que la xilanas, y que se puede observar en el área bajo la curva, así como en el número de subproductos obtenidos presentes en el gráfico respecto al control. Aunque no se identificaron los compuestos liberados de la hidrólisis se obtuvo un perfil útil para comparar con los hidrolizados del pericarpio de maíz.

4.3.7. Hidrólisis enzimática del pericarpio de maíz

El pericarpio de maíz se colocó en presencia de la xilanas y la hemicelulasa para evaluar su capacidad de hidrolizar el material. En la Figura 28 se observa una débil capacidad por parte de las enzimas para degradar el material. La línea negra corresponde al pericarpio de maíz en ausencia de enzima, la línea roja corresponde al pericarpio de maíz en presencia

de la hemicelulasa en la cual se observa un pico alrededor de los 4.5 minutos de mayor altura que en la línea azul que corresponde al pericarpio de maíz en presencia de la xilanasa. Es importante mencionar que se presentaron dificultades para analizar los hidrolizados en el HPAEC-PAD debido al alto contenido de sales de los hidrolizados de pericarpio de maíz.

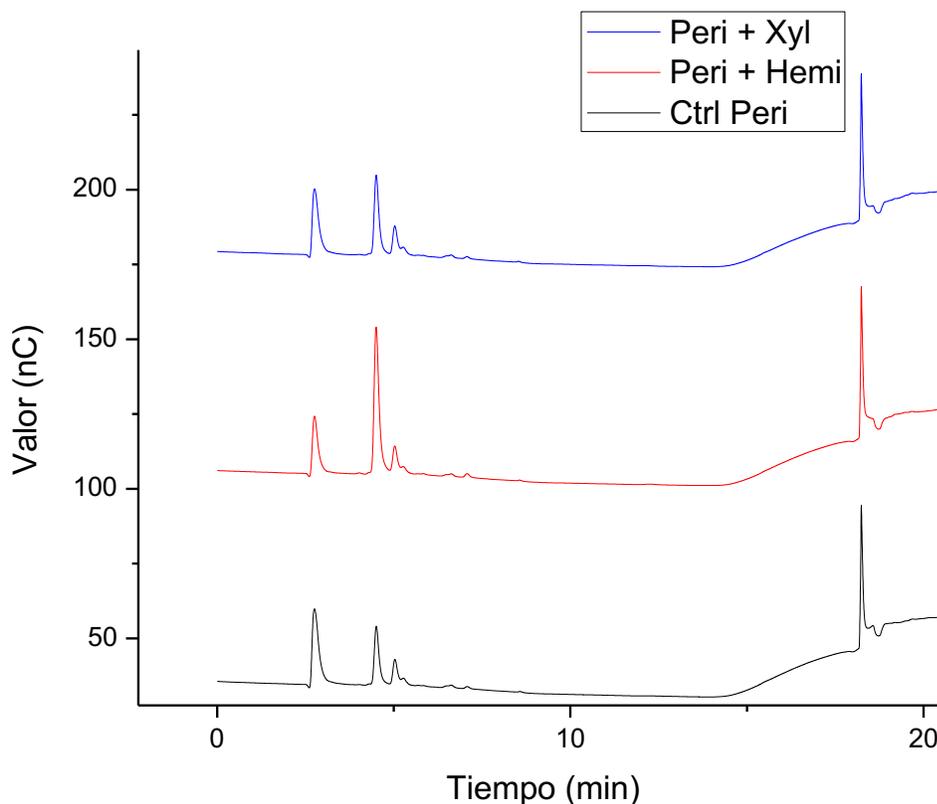


Figura 28. Cromatograma de la hidrólisis enzimática del pericarpio de maíz.

4.3.8. Ensayos enzimáticos del pericarpio de maíz

Una vez lavado el pericarpio de maíz, se continuó con el tratamiento enzimático para evaluar la liberación de azúcares reductores por las dos enzimas seleccionadas, la xilanasa y la hemicelulasa. Se utilizó pericarpio de maíz lavado solamente con agua (W-Xyl, W-Hemi) y el lavado con la mezcla propilenglicol/agua (1:1) (PG-Xyl, PG-Hemi).

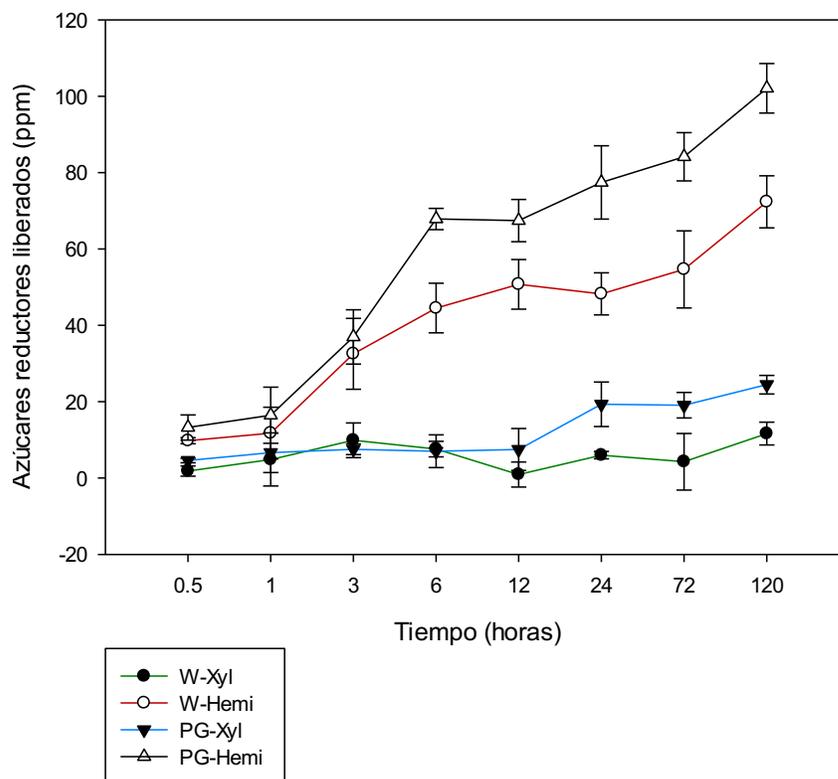


Figura 29. Azúcares reductores liberados por el tratamiento enzimático del pericarpio de maíz con diferentes tratamientos de lavado.

En la Figura 29 se observan los resultados de la cinética de liberación de azúcares reductores con respecto al tiempo de reacción. Se observa que la enzima que presentó mayor capacidad para degradar el pericarpio de maíz es la hemicelulasa con 72.33 ± 6.82 ppm para el pericarpio lavado con agua, y de 102.08 ± 6.46 ppm para el lavado con el propilenglicol/agua. Esto nos indica que se mejoró la liberación de azúcares reductores por parte de la hemicelulasa en alrededor de un 30%, que es una gran ventaja debido al costo de la enzima y en el mejoramiento que se logra con el pretratamiento de lavado.

La xilanasas aunque mejora su actividad enzimática al lavar el pericarpio con propilenglicol/agua, obtiene rendimientos muy bajos en cuanto a la liberación de azúcares reductores (lavado con agua 11.6346 ± 2.98 ppm, lavado con propilenglicol/agua 24.45 ± 2.43 ppm). Por lo tanto, se decidió utilizar la hemicelulasa para los análisis posteriores.

Estos resultados concuerdan con lo reportado, donde se demuestra que las enzimas xilanolíticas actúan sinérgicamente con las feruloil esterasas para degradar los xilanos (Grabber et al., 1998). Además, se observa que eliminando la proteína remanente en el pericarpio de maíz se mejora la digestibilidad del material por acción de ambas enzimas. Estas proteínas pueden actuar como barrera impidiendo el anclaje y acción de las enzimas.

4.3. Cavitación hidrodinámica

En la Figura 30 se muestra las gráficas del aumento de la temperatura con respecto al tiempo de HC. A los 15 minutos la temperatura llegó a un máximo de 58°C, y a los 60 minutos a un máximo de 116°C. Estas temperaturas pueden ayudar en la liberación de la proteína del pericarpio de maíz, ya que afectan la organización estructural de las proteínas.

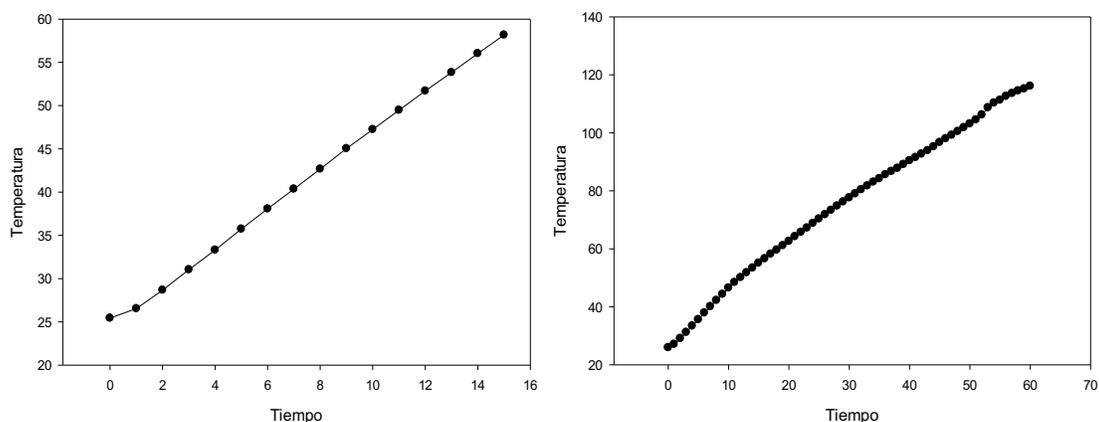


Figura 30. Aumento de la temperatura durante los procesos de cavitación hidrodinámica. (A) Cavitación Hidrodinámica durante 15 min. (B) Cavitación hidrodinámica durante 60 min.

Durante el proceso de HC el pericarpio de maíz es triturado, dando como resultado una arena muy fina. Esto dificultó el proceso de recuperación del material, por lo que se dejó sedimentar para recuperarlo por decantación.

$$y = 1.4711x - 31.171$$

$$R^2 = 0.9932$$

Ecuación 3. Regresión lineal del aumento de la temperatura con respecto al tiempo del proceso de cavitación hidrodinámica.

A través de la Ecuación 3 obtenida del proceso de cavitación hidrodinámica, podemos estimar la temperatura que alcanzará el reactor con respecto al tiempo. Esto puede ser de gran ayuda sobre todo si se trabaja con compuestos termoestables, o productos en donde la calidad del se ve afectada por la temperatura.

4.4.1. Efecto de la cavitación hidrodinámica en la liberación de proteína con respecto al número de lavados

El pericarpio de maíz obtenido después de la HC fue lavado con propilenglicol/agua como se describió anteriormente, con la finalidad de evaluar la cantidad de proteína extraída por cada lavado. En la Figura 31 se muestran los resultados, donde se observó que la mayor cantidad de proteína obtenida con relación a la absorbancia (589nm), se obtuvo después del proceso de HC (15 y 60 minutos) aunque con una mayor dispersión en la HC a los 15 minutos de proceso.

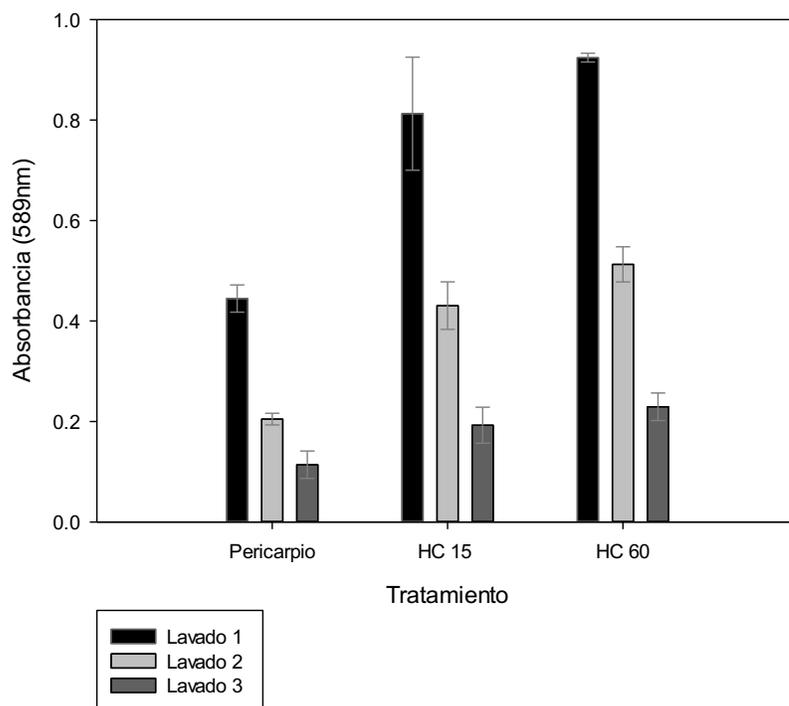


Figura 31. Efecto de la cavitación hidrodinámica en la liberación de proteína con respecto al número de lavados.

Esto significa que el proceso de trituración de la HC, y el aumento de la temperatura en el reactor facilitan la extracción de zeína del pericarpio de maíz. Así mismo, se observó que si disminuye significativamente la cantidad de zeína extraída con relación al número de lavados. En la tabla 12 se presentan los resultados de la cuantificación de zeína extraída para cada lavado. Es durante el proceso de HC a 60 minutos donde se obtuvo la mayor cantidad de zeína extraída, esto puede ser debido al incremento de la temperatura.

Tabla 12. Cuantificación de zeína extraída por cavitación hidrodinámica y propilenglicol/agua con respecto al número de lavados.

Muestra	mg de zeína/ 100 mg de pericarpio		
	Lavado 1	Lavado 2	Lavado 3
Pericarpio	1.5891 ± 0.0972	0.7320 ± 0.0414	0.4082 ± 0.0972
HC 15	2.9034 ± 0.4018	1.5391 ± 0.1687	0.6891 ± 0.1280
HC 60	3.3022 ± 0.0312	1.8320 ± 0.1250	0.8201 ± 0.0976

Tabla 13. ANOVA de la cantidad de zeína extraída por cavitación hidrodinámica y propilenglicol/agua con respecto al número de lavados.

Respuesta: mg de zeína/100 mg de pericarpio

	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.
No de lavados	2	17.6499	8.8250	313.855	1.017e-14 ***
Cavitación	2	5.6161	2.8081	99.867	1.804e-10 ***
No de lavados: Cavitación	4	1.4177	0.3544	12.605	4.608e-05 ***
Residuales	18	0.5061	0.0281		

Significancia: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En la Tabla 13 se presenta los resultados del ANOVA de dos vías para evaluar la significancia del efecto del número de lavados con propilenglicol y el tratamiento de HC en relación a los mg de zeína extraída por cada 100 mg de pericarpio de maíz. Con un P-valor < 0.05 podemos decir que el número de lavados, el tratamiento de HC y la interacción entre estos factores, son significativos en el proceso de extracción de proteína del pericarpio de maíz.

La HC presento la capacidad de extraer la proteína presente en el pericarpio de maíz, relacionado con el rompimiento del material y el aumento de la temperatura. Esta es una ventaja, ya que es posible realizar el proceso de lavado y de HC en un solo paso,

mejorando el rendimiento de extracción de proteína y por consecuencia los tratamientos enzimáticos posteriores.

4.4.2. Tratamiento enzimático del pericarpio de maíz después de la cavitación hidrodinámica

Una vez realizado el pretratamiento de lavado y el proceso de HC del pericarpio de maíz, se procedió con el tratamiento enzimático con la hemicelulasa seleccionada. El objetivo fue evaluar la cantidad de azúcares totales y azúcares reductores liberados por acción de la enzima, valorando la efectividad del proceso de HC.

Es importante determinar la cantidad de azúcares totales y azúcares reductores liberados, ya que de esta manera podemos identificar si la enzima con la que estamos trabajamos, escinde dentro de la cadena del polisacárido o en los extremos terminales, es decir, si se trata de una enzima de tipo endo o exo. Se relaciona la cantidad de azúcares totales y azúcares reductores. Si se observa una mayor cantidad de azúcares totales que reductores, significa que se trata de una endo enzima. Si se observan mayor cantidad de azúcares reductores que totales se trata de una exo enzima.

4.4.3. Determinación de los azúcares totales

En la Figura 32 se presentan los resultados de la degradación enzimática posterior a la HC. Se observó que lo mejores resultados se obtuvieron después de la HC a los 15 minutos, y esto puede deberse al gran incremento de la temperatura a los 60 minutos de HC, y que pudiese alterar su estructura.

Es evidente que la HC mejora la liberación de azúcares totales y la extracción de proteínas residuales en el pericarpio de maíz, industrialmente es muy atractivo ya que en un solo paso es posible obtener proteínas como zeínas, triturar el pericarpio de maíz para obtener los azúcares liberados.

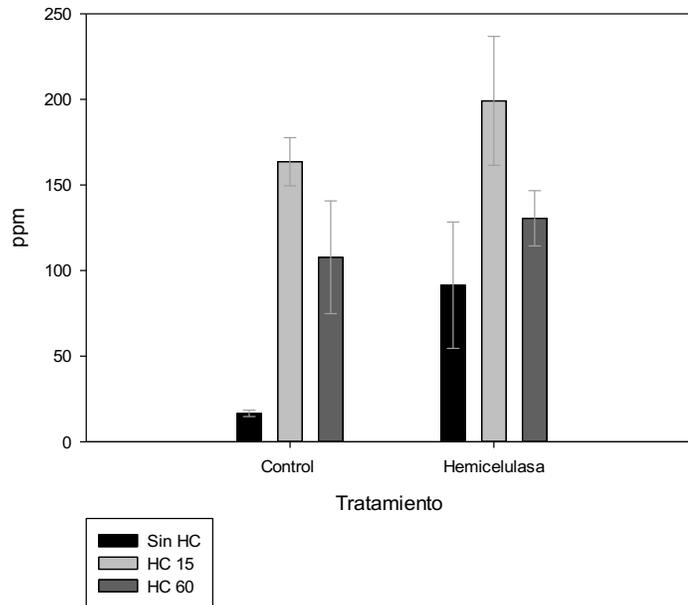


Figura 32. Cuantificación de los azúcares totales liberados por los diferentes tratamientos.

La hemicelulasa tuvo un efecto significativo en la liberación de azúcares totales, y se puede observar claramente en la gráfica observando el tratamiento sin HC, además el efecto es potenciado significativamente cuando el material es cavitado 15 minutos. Es importante destacar que los resultados presentan gran variación, debido a la dificultad de trabajar con el reactivo de orcinol y el ácido sulfúrico.

En la Tabla 14 se presenta los resultados del ANOVA de dos vías, para evaluar la significancia del efecto del tratamiento enzimático, con relación a los azúcares totales liberados del pericarpio de maíz después de la HC. Con un P-valor < 0.05 podemos decir que el tratamiento enzimático y el tiempo de HC son factores significativos en el proceso de liberación de azúcares totales.

Tabla 14. ANOVA del efecto del tratamiento enzimático con relación a los azúcares totales liberados.

Respuesta: mg de zeína/100 mg de pericarpio						
	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.	
Tratamiento	1	8870	8870.4	12.2931	0.004332 **	
Cavitación	2	48655	24327.5	33.7145	1.189e-05 ***	
Tratamiento: Cavitación	2	2210	1105.2	1.5317	0.255598	
Residuales	12	8659	721.6			

Significancia:	0	***	0.001	**	0.01	*
				0.05	.	0.1
					'	'
						1

4.4.4. Azúcares reductores

En la Figura 33 se muestran los resultados de la cuantificación de los azúcares reductores. Podemos observar claramente que existe diferencia significativa entre los tratamientos con enzima y sin enzima, aunque el mejor resultado se obtuvo con el tratamiento con la hemicelulasa después de la HC por 15 minutos. La HC tuvo un efecto negativo a los 60 minutos lo que disminuyó los azúcares reductores liberados, y esto puede deberse al aumento de la temperatura por encima de los 100°C.

La hemicelulasa es capaz de liberar los azúcares reductores sin el tratamiento de HC, pero se potencializa significativamente el efecto cuando el material es cavitado por 15 minutos. Este procedimiento resulta atractivo dada su capacidad de liberar proteínas y los azúcares totales y reductores presentes en el pericarpio, y con enzimas específicas liberar los arabinosilanos a un menor costo. Obtener los arabinosilanos es proceso complejo y costoso, por lo que combinar métodos físicos y enzimáticos puede ser la alternativa.

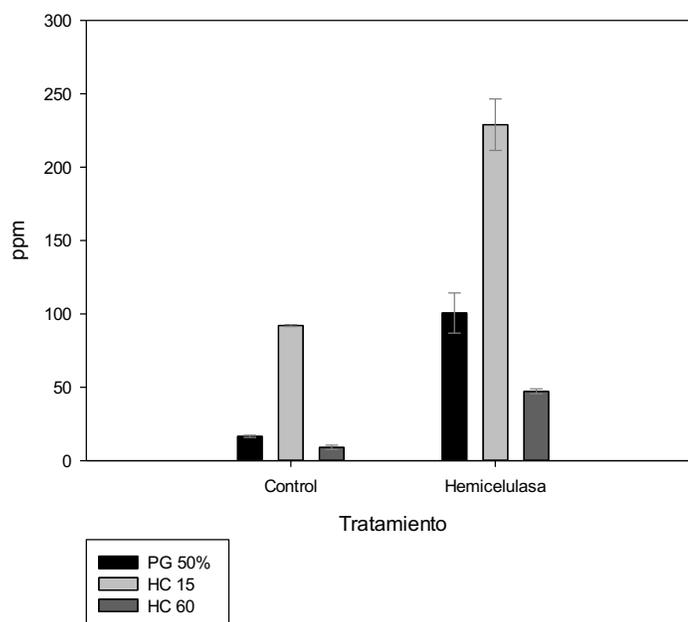


Figura 33. Cuantificación de los azúcares reductores liberados por los diferentes tratamientos.

En la Tabla 15 se presenta los resultados del ANOVA de dos vías, para evaluar la significancia del efecto del tratamiento enzimático, con relación a los azúcares reductores liberados del pericarpio de maíz después de la HC. Con un P-valor < 0.05 podemos decir que el tratamiento enzimático, el tiempo de HC y la interacción entre estos factores, son significativos en el proceso de liberación de azúcares totales.

Tabla 15. ANOVA del efecto del tratamiento enzimático con relación a los azúcares reductores liberados.

Respuesta: mg de zeína/100 mg de pericarpio						
	GL	S.C.	C.M.	F	P Val.	
Cavitación	2	57645	28823	345.861	2.459e-11	***
Tratamiento	1	33570	33570	402.826	1.339e-10	***
Cavitación: Tratamiento	2	7312	3656	43.872	3.032e-06	***
Residuales	12	1000	83			

Significancia:	0	'***'	0.001	'**'	0.01	'*'
				0.05	'.'	0.1
					' '	1

5. CONCLUSIONES

De los extractos enzimáticos evaluados solo dos resultaron viables para el propósito de este estudio, la hemicelulasa y la xilanasas. La hemicelulasa tuvo mayor efectividad en la hidrólisis del pericarpio de maíz. La xilanasas resultó ser un extracto enzimático de gran interés debido a su pureza y especificidad sobre el xilano y el arabinoxilano.

Se desarrolló un método alternativo de lavado del pericarpio de maíz para la obtención de zeína, utilizando una mezcla propilenglicol/agua (1:1), siendo de gran importancia ya que se trata de un solvente ecológico y aprobado por la FDA. Además, mejoró la degradabilidad del material en un 30% utilizando la hemicelulasa., lo que abre nuevas perspectivas en el campo de los cereales.

Se desarrolló un nuevo método para la cuantificación de zeína, utilizando una endoproteasa para hidrolizar la proteína y obtener un estándar de zeína, que puede ser analizado por el método de genipina para cuantificación de grupos amino libres. Este método puede ser una alternativa a los métodos de cuantificación por turbidimetría.

La cavitación hidrodinámica favoreció la extracción de proteínas presentes en el pericarpio de maíz, además mostró efectos positivos cuando se trabaja a tiempos cortos, al aumentar el tiempo se incrementa la temperatura lo que puede tener efectos negativos sobre el material con el que se esté trabajando.

Es posible producir arabinosilanos a partir de la combinación de la cavitación hidrodinámica con tratamientos enzimáticos, tratándose de un método alternativo y ecológico. Además son necesarios más análisis para conocer detalladamente su estructura.

6. APÉNDICE

6.1. Impacto ambiental del proceso

Como solución a la gran cantidad de residuos agroindustriales generados por el cultivo y consumo del maíz en nuestro país, se propone un proceso de producción de arabinosilanos utilizando pericarpio de maíz para generar productos de alto valor comercial, que al mismo tiempo permita reducir la contaminación por estos residuos.

El proceso propuesto para la producción de arabinosilanos se basa en el uso de enzimas, que han tenido un gran impacto dentro de los procesos industriales debido a que son catalizadores biológicos, que nos permiten obtener productos de alto valor agregado sin perjudicar al ambiente (Montiel Pacheco y Bustos Jaimes, 2014). Además se han desarrollado metodologías que permiten inmovilizar las enzimas, de manera que puedan ser reutilizadas mejorando la estabilidad operacional y reduciendo los costos de proceso (Rodríguez Alegría y Castillo Rosales, 2014).

El propilenglicol es un solvente aprobado por la FDA y no es considerado una sustancia peligrosa o tóxica. Además, se trata de un solvente que puede ser reciclado y reutilizado dentro del proceso de extracción de zeína, reduciendo a su vez costos de producción.

El proceso propuesto resulta ser una alternativa ecológica de aprovechamiento de residuos agroindustriales del maíz y que puede ser aplicado utilizando residuos de otros cereales. Además, con una baja generación de residuos peligrosos o tóxicos a diferencia de aquellos procesos, donde se utilizan soluciones ácidas o alcalinas altamente corrosivas y que requieren un tratamiento posterior para su desecho.

6.2. Abreviaturas

AAANa – Ácido Acético Acetato de Sodio	HPAEC-PAD– Cromatografía de intercambio aniónico con detector de pulsos amperométricos
AcAce – Acetilacetato	HC – Cavitación Hidrodinámica
AcMeFuc – Acetil metil fucosa	HG - Homogalacturonano
AP - Apiogalacturonano	KDO – Ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico
APA - Apiogalacturonano	Man – Manosa
Api – Apiosa	MeXyl- metil xilosa
Ara - Arabinosa	RG-I – Ramnogalacturonano I
AXOS - Arabinoxilano oligosacáridos	RG-II – Ramnogalacturonano II
AXs – Arabinoxilanos	Rha - Ramnosa
Dha – Ácido docosahexanoico	WEAX – Water Extractable Arabinoxylan
Fuc – Fucosa	WUAX – Water Unextractable Arabinoxylan
Gal – Galactosa	XG - Xiloglicano
GalA – Ácido galacturónico	XGA – Xilogalacturonano
GAX – Glucuronoarabinoxilano	Xyl – Xilosa
Glc - Glucosa	
GlcA – Ácido glucurónico	

Bibliografía

AACC International. 2000. Approved Methods of Analysis of the American Association of Cereal Chemists, 11th Ed. St. Paul, MN.

Norma Oficial Mexicana NOM-F-90-S-1978. Determinación de fibra cruda de alimentos. Disponible en: http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4799842&fecha=27/03/1979

Aguedo, M., C. Fougny, M. Dermience, y A. Richel. 2014. Extraction by three processes of arabinoxylans from wheat bran and characterization of the fractions obtained. *Carbohydr. Polym.* 105:317–324.

Ayala-Soto, F. E., S. O. Serna-Saldívar, S. García-Lara, y E. Pérez-Carrillo. 2014. Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocoll.* 35:471–475.

Badui Dergal, S. 2006. *Química de los alimentos*. Pearson Educación.

Bayer, E. a., H. Chanzy, R. Lamed, y Y. Shoham. 1998. Cellulose, cellulases and cellulosomes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:548–557.

Beg, Q. K., M. Kapoor, L. Mahajan, y G. S. Hoondal. 2001. Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:326–338.

Borneman, W. S., R. D. Hartley, W. H. Morrison, D. E. Akin, y L. G. Ljungdahl. 1990. Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33:345–351.

Caffall, K. H., y D. Mohnen. 2009. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* 344:1879–1900.

Capek, P., V. Sasinkova, N. Wellner, A. Ebringerova, y M. Kac. 2000. FT-IR study of plant cell wall model compounds : pectic polysaccharides and hemicelluloses. 43:195–203.

Carrillo Cortés, O. E., G. Galindo Contreras, y I. García Trinidad. 2012.

Reproducción de cavitación hidrodinámica luminiscente para la limpieza de agua a nivel terciario [Thesis]. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Collins, T., C. Gerday, y G. Feller. 2005. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:3–23.

Dornez, E. 2007. Insight into the distribution and variability of endoxylanases in wheat and their functionality during bread making [Thesis]. Catholic University of Leuven, Leuven, Belgium.

Eichhorn, S. J., A. Dufresne, M. Aranguren, N. E. Marcovich, J. R. Capadona, S. J. Rowan, C. Weder, W. Thielemans, M. Roman, S. Renneckar, W. Gindl, S. Veigel, J. Keckes, H. Yano, K. Abe, M. Nogi, a. N. Nakagaito, A. Mangalam, J. Simonsen, a. S. Benight, A. Bismarck, L. a. Berglund, y T. Peijs. 2010. Review: Current international research into cellulose nanofibres and nanocomposites. *J. Mater. Sci.* 45:1–33.

Esen, A. 1986. Separation of Alcohol-Soluble Proteins (Zeins) from Maize into Three Fractions by Differential Solubility. *Plant Physiol.* 80:623–627.

FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana.

Galindo, C. L., L. Cárdenas, J. Ramírez, S. Rivas, N. Domínguez, E. Torres Bahena, R. Arreola Alemón, y I. Domínguez Guerrero. 2012. Biodiversidad Mexicana. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Disponible en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/maiz.html>

Gaytán-Martínez, M. 2011. Estudio del calentamiento óhmico para la obtención de masa y harinas de maíz nixtamalizado [Thesis]. Instituto Politécnico Nacional, Querétaro, Qro.

Giuberti, G., A. Gallo, y F. Masoero. 2012. Technical note: Quantification of zeins from corn, high-moisture corn, and corn silage using a turbidimetric method: Comparative efficiencies of isopropyl and tert-butyl alcohols. *J. Dairy Sci.* 95:3384–3389.

Gogate, P. R., y A. M. Kabadi. 2009. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. *Biochem. Eng. J.* 44:60–72.

Gogate, P. R., y A. B. Pandit. 2005. A review and assessment of hydrodynamic cavitation as a technology for the future. *Ultrason. Sonochem.* 12:21–27.

González Muñoz, S. S. 2010. Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado. Disponible en: [http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento de esquilmos.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/desarrolloRural/Documents/fichasaapt/Aprovechamiento_de_esquilmos.pdf)

Grabber, J. H., R. D. Hatfield, y J. Ralph. 1998. Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* 77:193–200.

Huber, T., J. Müssig, O. Curnow, S. Pang, S. Bickerton, y M. P. Staiger. 2012. A critical review of all-cellulose composites. *J. Mater. Sci.* 47:1171–1186.

INEGI. 2012. El sector Alimentario en México. N. 26, editor. Inst. Nac. Estadística Geogr. e Informática. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/socio-demografico/SAM/2012/sam2012.pdf

Ioelovich, M. 2008. Cellulose as a nanostructured polymer: A short review. *BioResources* 3:1403–1418.

Izydorczyk, M. S., y J. E. Dexter. 2008. Barley β -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products—a Review. *Food Res. Int.* 41:850–868.

Jayani, R. S., S. Saxena, y R. Gupta. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochem.* 40:2931–2944.

Juturu, V., y J. C. Wu. 2014. Microbial Exo-xylanases: A Mini Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 174:81–92.

Kamel, S., N. Ali, K. Jahangir, S. M. Shah, y a. a. El-Gendy. 2008. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *Express Polym. Lett.* 2:758–778.

Kashyap, D. R., P. K. Vohra, S. Chopra, y R. Tewari. 2001. Applications of

pectinases in the commercial sector: A review. *Bioresour. Technol.* 77:215–227.

Kim, I., I. Lee, S. H. Jeon, T. Hwang, y J.-I. Han. 2015. Hydrodynamic cavitation as a novel pretreatment approach for bioethanol production from reed. *Bioresour. Technol.* 192:335–9.

Lapierre, C., B. Pollet, M. C. Ralet, y L. Saulnier. 2001. The phenolic fraction of maize bran: Evidence for lignin-heteroxylan association. *Phytochemistry* 57:765–772.

Larson, J., y P. C. Hoffman. 2008. Technical Note: A Method to Quantify Prolamin Proteins in Corn That Are Negatively Related to Starch Digestibility in Ruminants.

Lehtinen, O.-P. 2012. Modifying wheat bran for food applications - Effect of wet milling and enzymatic treatment [Thesis]. Metropolia University of Applied Sciences, Helsinki, Finlandia.

Longland, J. M., S. C. Fry, y a J. Trewavas. 1989. Developmental Control of Apiogalacturonan Biosynthesis and UDP-Apiose Production in a Duckweed. *Plant Physiol.* 90:972–976.

Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, y R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265–275.

Mannheim, A., y M. Cheryan. 1993. Water-soluble zein by enzymatic modification in organic solvents. *Cereal Chem. J.* 70:115–121.

McFarlane, H. E., A. Döring, y S. Persson. 2014. The cell biology of cellulose synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65:69–94.

Megazyme. 2016. Carbohydrates - Polysaccharides. Disponible en: <http://www.megazyme.com/>

Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:266–277.

Montiel Pacheco, C., y I. Bustos Jaimes. 2014. Procesos enzimáticos amigables con el ambiente. *Rev. Digit. Univ. UNAM.*

Morales-Ortega, A., G. Niño-Medina, E. Carvajal-Millán, A. Gardea-Béjar, P. Torres-Chávez, Y. López-Franco, A. Rascón-Chu, y J. Lizardi-Mendoza. 2013. Los arabinoxilanos ferulados de cereales: Una revisión de sus características fisicoquímicas y capacidad gelificante. *Rev. Fitotec. Mex.* 36:439–446.

Moron, C., I. Zacarias, y S. de Pablo. 1997. Produccion y manejo de datos de composicion quimica de alimentos en nutricion. FAO. Direccion de Alimentacion y Nutricion.

Mussatto, S. I., M. Fernandes, A. M. F. Milagres, y I. C. Roberto. 2008. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme Microb. Technol.* 43:124–129.

Nelson, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 3:375–380.

Niño-Medina, G., E. Carvajal-Millán, A. Rascon-Chu, J. Marquez-Escalante, V. Guerrero, y E. Salas-Muñoz. 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications. *Phytochem. Rev.* 9:111–120.

Ochiai, E. I. 1984. *Química bioinorgánica: una introducción*. Createspace Independent Pub.

Pastor, J. F., Ó. Gallardo, J. Sanz-Aparicio, y P. Díaz. 2007. Xylanases: Molecular Properties and Applications. En: J. Polaina y A. MacCabe, editores. *Industrial Enzymes*. Springer Netherlands. p. 65–82.

Pérez, S., M. a. Rodríguez-Carvajal, y T. Doco. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* 85:109–121.

Quiroz-Castañeda, R. E., y J. L. Folch-Mallol. 2011. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives.

Rabinovich, M. L., M. S. Melnick, y A. V. Bolobova. 2002. The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochem.* 67:850–871.

Ramos-Ponce, L. M., M. Vega, G. C. Sandoval-Fabián, E. Colunga-Urbina, N. Balagurusamy, F. J. Rodriguez-Gonzalez, y J. C. Contreras-Esquivel. 2010. A simple colorimetric determination of the free amino groups in water soluble chitin derivatives using genipin. *Food Sci. Biotechnol.* 19:683–689.

Ramseyer, D. D., A. D. Bettge, y C. F. Morris. 2011. Distribution of total, water-unextractable, and water-extractable arabinoxylans in wheat flour mill streams. *Cereal Chem.* 88:209–216.

Rodríguez Alegría, M. E., y E. Castillo Rosales. 2014. Enzimas aplicadas en procesos industriales. *Rev. Digit. Univ. UNAM2.*

Roets, C. 2009. Effect of endoxylanases, endoglucanases and their combination on wheat flour bread quality [Thesis]. Stellenbosch University, Stellenbosch, South Africa.

Sadhu, S., y T. K. Maiti. 2013. Cellulase Production by Bacteria : A Review. *Br. Microbiol. Res. J.* 3:235–258.

Saldívar, S. R. O. S. 1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales. AGT Editor.

Serban, D. E. 2014. Gastrointestinal cancers: Influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Lett.* 345:258–270.

Shukla, R., y M. Cheryan. 2001. Zein: the industrial protein from corn. *Ind. Crops Prod.* 13:171–192.

Smith, M. M., y R. D. Hartley. 1983. Occurrence and nature of ferulic acid substitution of cell-wall polysaccharides in graminaceous plants. *Carbohydr. Res.* 118:65–80.

Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*:19–23.

Valencia Ojeda, C. 2013. Estudio de la degradación enzimática de xilanos en harinas de trigo para la panificación [Thesis]. Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Querétaro.

Vincken, J.-P., H. a Schols, R. J. F. J. Oomen, M. C. McCann, P. Ulvskov, A. G. J. Voragen, y R. G. F. Visser. 2003. If homogalacturonan were a side chain of rhamnogalacturonan I. Implications for cell wall architecture. *Plant Physiol.* 132:1781–1789.

Wall, J.S. , Paulis, J. W. 1978. Corn and sorghum grain proteins. *Adv. Cereal Sci. Technol.* 2:135–219.

Wallace, J. C., M. A. Lopes, E. Paiva, y B. A. Larkins. 1990. New Methods for Extraction and Quantitation of Zeins Reveal a High Content of γ -Zein in Modified opaque-2 Maize. *Plant Physiol.* 92:191–196.

Wang, J., B. Sun, Y. Liu, y H. Zhang. 2014. Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran. *Food Chem.* 150:482–488.