



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA



**“ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE
XILANOS EN HARINAS DE TRIGO PARA PANIFICACIÓN”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

CASANDRA VALENCIA OJEDA

DIRIGIDA POR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2013.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA DE
XILANOS EN HARINAS DE TRIGO PARA PANIFICACIÓN”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

CASANDRA VALENCIA OJEDA

DIRIGIDA POR

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ

SINODALES

Dr. SERGIO DE JESÚS ROMERO GÓMEZ
DIRECTOR

Dr. ROBERTO MARTÍNEZ CAMPOS
CO-DIRECTOR

Dr. JUAN CAMPOS GUILLÉN
SINODAL

M. en C. BEATRIZ LILIANA ÁLVAREZ MAYORGA
SINODAL

Handwritten signatures and names in black ink. The top signature is "Sergio de Jesús Romero Gómez" with a horizontal line below it. Below that is "Roberto Martínez Campos" with a horizontal line. The next is "Juan Campos Guillén" with a horizontal line. The bottom signature is "M. en C. Beatriz Liliana Álvarez Mayorga" with a horizontal line.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Introducción	1
1.2 El trigo	2
1.2.1 Composición del grano de trigo	2
1.2.2 Molienda del trigo	3
1.3 Harina de trigo	4
1.3.1 Almidón	4
1.3.2 Proteínas	5
1.3.2.1 Proteínas solubles	6
1.3.2.2 Proteínas no solubles	6
1.3.3. Polisacáridos no almidonosos	7
1.3.3.1 Arabinoxilanos	8
1.3.4 Lípidos	10
1.3.5 Enzimas	11
1.4. Proceso de panificación y aditivos	13
1.4.1 Amasado	13
1.4.2 Fermentación	13
1.4.3 Horneado	14
1.4.4 Aditivos	15
1.5 Enzimas xilanolíticas	15
1.5.1 Clasificación	17
1.5.1.1 Endo- β -(1 \rightarrow 4)-D-xilanasas (EC 3.2.1.8)	17

1.5.1.2 β -xilosidasa o xilobiasa (EC 3.2.1.37)	18
1.5.1.3 α -arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55)	19
1.5.1.4 α -D-glucoronidasas (EC 3.2.1.1)	19
1.5.1.5 Esterasas	19
1.5.2 Microorganismos productores de xilanasas	19
1.6 Importancia de las xilanasas en la industria de la panificación	21
2. OBJETIVOS	234
2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. METODOLOGÍA	25
3.1 Materiales	25
3.1.1 Enzimas	25
3.1.2 Sustratos	25
3.1.3 Estándares	25
3.1.4 Material cromatográfico	26
3.2 Métodos	26
3.2.1 Preparación de los sustratos	26
3.2.2 Ensayos enzimáticos	26
3.2.2.1 Hidrólisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas	26
3.2.2.2 Cinética de la hidrolisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas	28
3.2.2.3 Análisis de los cambios estructurales de la harina de trigo por efecto de las xilanasas a diferentes dosis y tiempos.	28
3.2.2.4 Hidrólisis enzimática de harina de trigo por efecto de las xilanasas de diferentes proveedores	28
3.2.4 Análisis cualitativo de xilosacáridos por TLC.	29
3.2.5 Análisis cuantitativo del contenido de xilooligosacáridos por el método de fenol-ácido sulfúrico.	30

4. RESULTADOS	31
4.1 Determinación del frente relativo de monosacáridos y xilooligosacáridos estándar	31
4.2 Determinación de la concentración para la aplicación del estándar mezclado de xilooligosacáridos.	32
4.3 Variabilidad de los Rf de los xilooligosacáridos	34
4.4 Hidrolisis de arabinoxilano puro por diferentes xilanasas estándares.	35
4.5 Cinética de la hidrolisis enzimática del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas estándares	36
4.6 Hidrolisis de la harina por xilanasas estándares a diferentes dosis y tiempo.	38
4.7 Hidrolisis de arabinoxilano puro por enzimas comerciales	42
4.8 Hidrolisis de harina de trigo por enzimas comerciales	43
5. DISCUSIÓN	45
5.1 TLC como herramienta para el análisis cualitativo de xilooligosacáridos	45
5.2 Perfiles de degradación de arabinoxilano por el uso de diferentes enzimas	45
5.3 Cinética de la hidrolisis de arabinoxilano	46
5.4 Hidrolisis de la harina por xilanasas estándares a diferentes dosis y tiempo	47
5.5 Actividad de las enzimas comerciales	48
6. CONCLUSIONES	50
7. BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadros		Página
1	Enzimas sugeridas para la mejora del pan y de la harina (no exclusivas).	16
2	Características de algunas xilanasas producidas por diferentes microorganismos.	20
3	Información de las enzimas utilizadas como estándar.	27
4	Factor de retención (Rf) de los azúcares estándar.	32
5	Frentes relativos de los diferentes xilooligosacáridos utilizados como estándares en diferentes pruebas.	34
6	Relación de los xilooligosacáridos obtenidos por la hidrólisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas	36
7	Azúcares totales liberados por la enzima de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> a concentraciones de 45 U/ml (TL 45) y 90 U/ml (TL 90) sobre harina de trigo.	40
8	Azúcares totales liberados por la enzima de <i>Thermotoga maritima</i> a concentraciones de 45 U/ml (TM 45) y 90 U/ml (TM 90) sobre harina de trigo.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		Página
1	Corte longitudinal y transversal de un grano de trigo.	3
2	Clasificación de los AX en la harina de trigo de acuerdo a su extractabilidad.	9
3	Elementos estructurales del AX.	10
4	Estructura del xilano y los sitios de ataque por las enzimas xilanólíticas.	18
5	Mecanismo detrás de la funcionalidad de las endoxilanasas en la panificación.	23
6	TLC de azúcares estándares.	31
7	Estándares de xilooligosacáridos a diferentes concentraciones.	33
8	Hidrólisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas.	35
9	Hidrolisis enzimática del arabinoxilano puro con diferentes xilanasas.	37
10	Digestión de la harina con xilanasas de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> .	38
11	Digestión de la harina con xilanasas de <i>Thermotoga maritima</i> .	39
12	Hidrolisis de la harina con diferentes xilanasas a diferentes dosis y tiempos.	40
13	Hidrolisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas comerciales.	42
14	Hidrolisis de la harina por diferentes xilanasas comerciales.	43
15	Azúcares totales liberados por las enzimas comerciales.	44

RESUMEN

El uso de enzimas como aditivos representa una importante tecnología en la industria de la panificación. Dentro de los componentes que otorgan las características reológicas a la masa se encuentran polisacáridos no almidonosos llamados xilanos por lo que la adición de enzimas xilanolíticas durante el proceso de elaboración del pan es muy común y se requiere de una herramienta de análisis para poder controlar las características otorgadas basados en la actividad y perfil de hidrolisis de cada enzima. En el presente trabajo se obtuvieron los perfiles de degradación de las xilanasas de los organismos *Bacillus stearothermophilus*, *Thermotoga marítima*, microorganismos del rumen, *Trichoderma longibrachiatum* y *Aspergillus niger* sobre arabinoxilano, mostrando un mejor perfil las enzimas correspondientes a *T. marítima* y *T. longibrachiatum*. También se analizaron los perfiles de cuatro enzimas comerciales: Pentopan Mono, Pentopan Plus, HPI FAX y Bakezyme HSP, de las cuales Pentopan Plus resultó tener una mayor actividad, mientras que la enzima HPI FAX fue la única que presentó en su perfil de degradación la liberación de arabinosa la cual podría otorgar un valor agregado al proceso de panificación. Así mismo se comparó la actividad de las enzimas comerciales con las dos enzimas estándares que presentaron un mejor perfil observándose que estas últimas poseen una mayor actividad sobre la harina. La metodología de hidrolisis y análisis de xilanos por cromatografía en capa fina resultó una herramienta útil para la determinación de perfiles de xilooligosacáridos en muestras de hidrolisis de xilanasas usando como sustrato arabinoxilano puro o harina de trigo comercial.

1. ANTECEDENTES

1.1 Introducción

El trigo constituye una de las ocho fuentes alimentarias (trigo, arroz, maíz, azúcar, ganado vacuno, sorgo, mijo y mandioca) que proporcionan del 70-90% de todas las calorías y 66-90% de las proteínas consumidas en los países en desarrollo, siendo el alimento básico más importante para cerca del 36% de la población. Globalmente representa casi el 55% de los hidratos de carbono y 20% de las calorías consumidas (Farag, 2004).

En México el trigo es el tercer cultivo más producido después del maíz y el sorgo con una producción aproximada de 3778.4 miles de toneladas para el 2011 y 3124.9 miles de toneladas hasta el mes de octubre del 2012, siendo el segundo producto agropecuario más consumido con una cifra de consumo preliminar de 7027 miles de toneladas en el transcurso del 2011 (INEGI, 2012).

Para ser consumido por humanos el trigo requiere de su transformación en harina, lo cual ubica a la industria harinera como el eslabón estratégico de la cadena producción-consumo y la constituye como principal demandante del grano. Además, la harina cruda no es digerible por el sistema digestivo humano, por lo que requiere de cocción, siendo utilizada como materia prima en algunas industrias que la transforman cocinada a productos masivos terminales.

Por lo anterior, la mayor demanda del cereal en nuestro país la tiene la industria harinera, la que a su vez provee de materia prima a los fabricantes de la industria del pan, en donde la calidad del producto es determinada por la cantidad y la calidad de la proteína del grano (SAGARPA, 2008).

1.2 El trigo

El trigo es cultivado bajo un gran rango de condiciones ambientales, variando ampliamente su apariencia y características dependiendo del clima y de las condiciones en que sea cultivado (Wang, 2003; Roets, 2009). Aproximadamente 75% de la producción de trigo mundial es usada para consumo humano, mientras el 15% es usado para alimentación animal y el 10% restante como semilla y aplicaciones industriales (Carter, 2002).

El trigo se divide normalmente en dos clases basados en su utilidad para hacer pan: duro o suave y fuerte o débil. El trigo duro tienen una semilla dura que produce harina con una gran cantidad de gluten y consecuentemente un alto contenido de proteína, siendo conveniente para producir rebanadas de pan estilo occidental y algunos tipos de fideos. El trigo suave es caracterizado por su bajo contenido de proteína, siendo más utilizado para la producción de galletas y pasteles que requieren una harina con menor fuerza. Otra clasificación también usada es según su color, clasificándose como rojo o blanco (Oleson, 1994).

1.2.1 Composición del grano de trigo

El trigo produce una sola semilla como fruto seco llamada cariopsis o, más comúnmente granos de trigo (Dornez, 2007). La estructura del grano de trigo se muestra en la Figura 1. Los tejidos constituyentes del grano son el salvado (13-17%), el endospermo (81-84%) y el germen (2-3%). La cubierta del grano consiste en varias capas distintas como se evidencia en los detalles gráficos en la Figura 1.

El salvado es rico en proteína, celulosa, hemicelulosas y cenizas; el pericarpio y la aleurona contienen más pentosanos (35% y 39% respectivamente); el germen es rico en proteínas, grasas, azúcares y cenizas; mientras que el endospermo consiste gran parte en almidón (Wang, 2003).

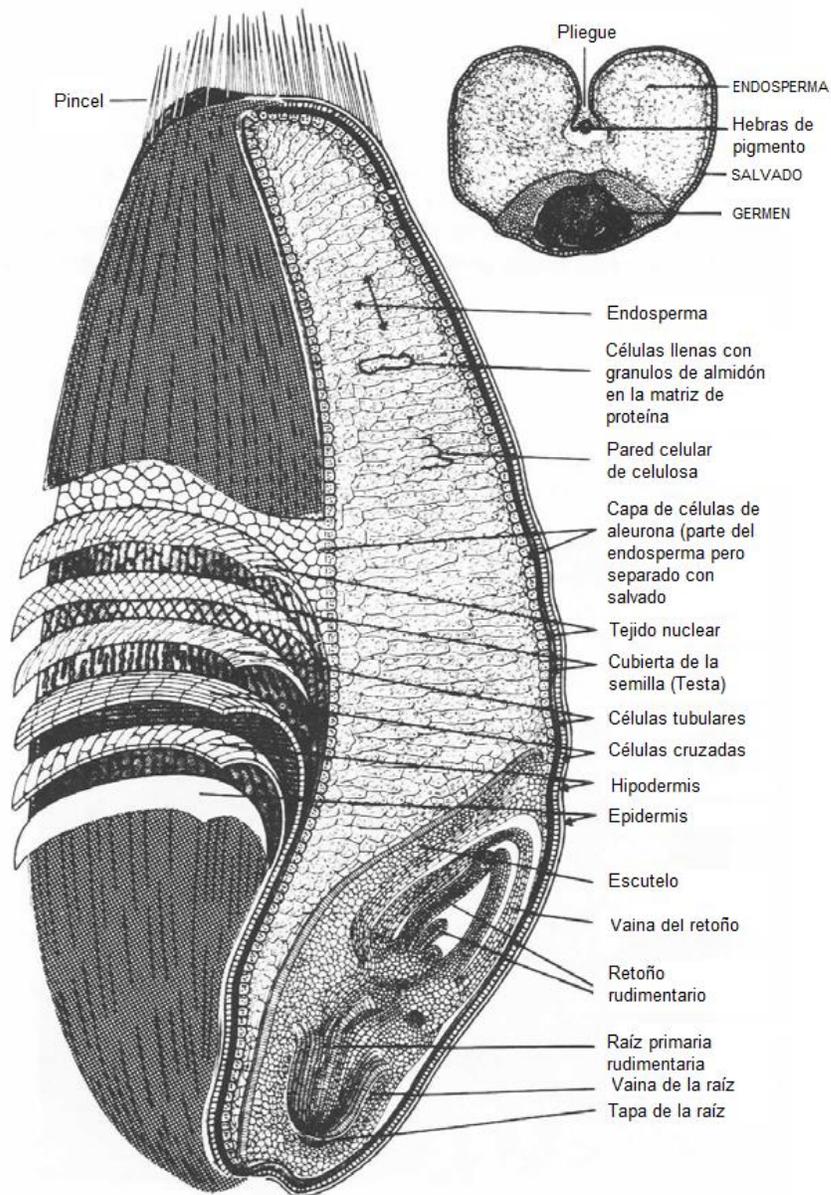


Figura 1. Corte longitudinal y transversal de un grano de trigo (Hoseney, 1994).

1.2.2 Molienda del trigo

El endospermo almidonoso es la parte que tiene mayor valor comercial de grano de trigo, ya que el endospermo da lugar a la harina después de la molienda. Las

células del endospermo están empaquetadas con gránulos de almidón embebidos en una matriz de proteína de gluten. Las paredes celulares del endospermo son ricas en polisacáridos no almidonosos, como arabinoxilano.

Durante la molienda convencional del trigo, el material almidonoso del endospermo es separado de las capas de salvado externas de los granos de trigo, es decir, pericarpio, la cubierta de la semilla, la epidermis nuclear y la aleurona. Los granos de trigo son molidos en una serie de rodillos de molienda para romper los granos y reducir el tamaño de sus partículas. Las partículas del endospermo resultante son subsecuentemente separadas de las partículas de germen y salvado. Al final del proceso de la molienda, aproximadamente 75% del trigo es convertido en harina (Dornez, 2007).

1.3 Harina de trigo

La harina de trigo es el principal ingrediente para la elaboración de pan. Una composición promedio de la harina de trigo está representada por almidón (70%-75%), agua (14%) y proteínas (10-12%). Los polisacáridos no almidonosos (2-3%), en particular arabinoxilanos, y lípidos (2%), son constituyentes menores de una gran importancia para la producción y calidad del pan (Roets, 2009; Vega, 2009).

1.3.1 Almidón

El almidón es el carbohidrato de reserva más importante y el componente más abundante en muchas plantas, incluyendo cereales. Se compone de unidades de D-glucopiranosil unidas por enlaces α -(1,4). Sus componentes principales son la amilosa (25-28%), polisacárido poco ramificado que consiste en más de 2000 unidades de glucosa con un peso molecular que oscila entre de 250 000 a 1.9 millones; y la amilopectina (72-75%) un polisacárido grande, muy ramificado, que

se compone de 20 a 30 unidades de glucosa por rama, con un peso molecular que varía de 1 millón a 100 millones (Roets, 2009).

El almidón está presente en el estado nativo de la masa en donde aparece como dos poblaciones de gránulos semicristalinos: los grandes, lenticulares (tipo A): con diámetros de 14 a 40 micras, y los pequeños, esféricos (tipo B): con un diámetro de entre 1 millón a 100 millones de micras. Los gránulos de almidón se componen de amilosa y amilopectina (Wang, 2003). A temperatura ambiente, los gránulos de almidón pueden absorber hasta un 50% de su peso seco de agua (French, 1984) y durante la cocción, cuando la suspensión de almidón se calienta, los gránulos absorben más agua y se hinchan (Hug-Iten y col., 1999).

La forma solubilizada de la amilosa forma una red continua tras el enfriamiento, en el que los gránulos hinchados y deformados están incrustados y vinculados entre sí. Durante este tiempo, los polisacáridos amiláceos se reasocian a un estado más cristalino conocido como retrogradación (Atwell y col., 1988). Durante el almacenamiento, el pan pierde gradualmente su frescura y se endurece. El proceso de endurecimiento comprende varios aspectos como la pérdida de humedad y el sabor, se endurece la corteza y la miga se hace más firme y menos elástica. La dureza de la miga durante el envejecimiento se atribuye principalmente a la retrogradación de la amilopectina, mientras que se considera que la amilosa tiene poca contribución en el endurecimiento de la miga (Roets, 2009).

1.3.2 Proteínas

Las proteínas son el componente más importante de la harina de trigo con respecto a las características de la panificación (Wang, 2003). Las proteínas de la harina pueden ser divididas en solubles, que no forman masa (15%): albúmina, globulina y péptidos; e insoluble, que forman masa (85%): gliadina y glutenina.

Aquellas proteínas que no forman masa son proteínas solubles que no forman parte del gluten. Están en muy pequeñas cantidades, proviniendo principalmente de las capas externas del grano, se disuelven en agua y quedan distribuidas en la misma. Las proteínas no solubles son las que al contacto con el agua forman una red proteica llamada gluten y son las encargadas en dar las características reológicas a la masa (Calaveras, 2004).

1.3.2.1 Proteínas solubles

La fracción de proteína que no forma el gluten se conforma de aproximadamente 60% albúminas y 40% globulinas, péptidos, aminoácidos, enzimas de la harina, proteínas solubles y espumantes, así como proteínas coagulables (Roets, 2009). La mayoría de estas proteínas son metabólicas (principalmente enzimas) o proteínas estructurales. Aunque se acepta en general que la fracción de gluten determina el potencial para hacer pan de la harina de trigo, algunas proteínas que no pertenecen al gluten también pueden desempeñar un papel importante. Varias enzimas endógenas de trigo (tales como proteasas y endoxilanasas) e inhibidores de enzimas (tales como inhibidores de la proteasa y los inhibidores de xilanasas) tienen el potencial de afectar el rendimiento de la panificación (Veraverbeke y Delcour, 2002).

1.3.2.2 Proteínas no solubles

Las proteínas del gluten son las proteínas de almacenamiento principales en el trigo y pertenecen a la clase prolamina de proteínas de almacenamiento en semillas (Shewry y Halford, 2002). La fracción de gluten consiste en aproximadamente 45% gliadinas y 55% gluteninas, siendo necesaria la presencia de ambas proteínas para su formación (Calaveras, 2004).

Durante el mezclado de la masa, la harina es hidratada y debido a la energía mecánica impresa las proteínas del gluten son transformadas en una red continua de proteína elástica o gluten (Singh y MacRitchie, 2001). Las gluteninas proporcionan resistencia y elasticidad, mientras que las gliadinas proporcionan extensibilidad en la masa de harina de trigo, siendo necesario un equilibrio adecuado entre estas proteínas.

La red de gluten juega un papel fundamental reteniendo el dióxido de carbono producido durante las primeras etapas de la fermentación y durante la cocción, etapa donde ocurren los cambios en la hidrofobicidad de la superficie de las proteínas. La estructura típica esponjosa del pan horneado es formada como resultado de los cambios inducidos por el calentamiento, así como los cambios en el almidón (Roets, 2009). El papel de las proteínas de gluten durante el envejecimiento del pan todavía no está clara, pero se cree que las interacciones entre el gluten y el almidón están de algún modo implicadas en el endurecimiento del pan (Gray y Bemiller, 2003).

1.3.3. Polisacáridos no almidonosos

Los polisacáridos no almidonosos, originados de la pared celular de la aleurona y el endospermo del grano de trigo, representan diferentes polisacáridos que están constituidos por azúcares pentosas (llamados pentosanos, principalmente arabinosilanos) y azúcares hexosas (Wang, 2003). Los polisacáridos no almidonosos pueden ser divididos en celulosas, B-glucanos, lignina, sustancias pécticas y pentosanos o hemicelulosas. Los pentosanos o hemicelulosas comprenden los polisacáridos no almidonosos y no celulósicos de las plantas, incluyendo arabinosilanos, arabinogalactanos y glucomanos (Roets, 2009).

1.3.3.1 Arabinoxilanos

Los arabinoxilanos (AX) son el polisacárido no almidonoso más abundante de la pared celular del grano de trigo, constituyendo del 65 al 70% en las paredes del endosperma y en una menor concentración en la harina de trigo con un aproximado de 1.5-2.5%. Son clasificados en dos grupos según sus propiedades fisicoquímicas: 20-30% de los arabinoxilanos son extraíbles con agua (WE-AX), mientras los restantes 70-80% son no extraíbles en agua (WU-AX), pero una fracción de estos puede ser después solubilizada por trabajo mecánico o tratamiento enzimático. A pesar de que los arabinoxilanos son un constituyente menor en la harina, por sus propiedades fisicoquímicas únicas, afectan en gran medida las características de la masa y del pan (Dornez y col., 2007).

Cuando los arabinoxilanos no extraíbles en agua son tratados con bases, los enlaces entre las moléculas de arabinoxilano se rompen. Una gran parte de las moléculas de los WU-AX se libera de la pared celular y se convierte en AX solubles en agua (AS-AX). Esto se refiere a la solubilización alcalina. Un tratamiento de los WU-AX con endoxilanasas también resulta en la solubilización, con la generación de AX solubilizados por enzimas (ES-AX). Mientras que el peso molecular de cada AX de los AS-AX permanece inalterado, los ES-AX tienen pesos moleculares menores por la hidrólisis del esqueleto de xilano. Las diferentes fracciones de AX son mostrados en la Figura 2 (Courtin y Delcour, 2002).

A pesar de que los AX pueden ser divididos en dos fracciones, poseen una estructura general. Los AX están formados por una cadena principal de residuos de 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 solo residuo de arabinofuranosil. El ácido ferúlico, 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 AX

con otras macromoléculas de la pared celular (Figura 3) (Dornez, 2007; Courtin y Delcour, 2002).

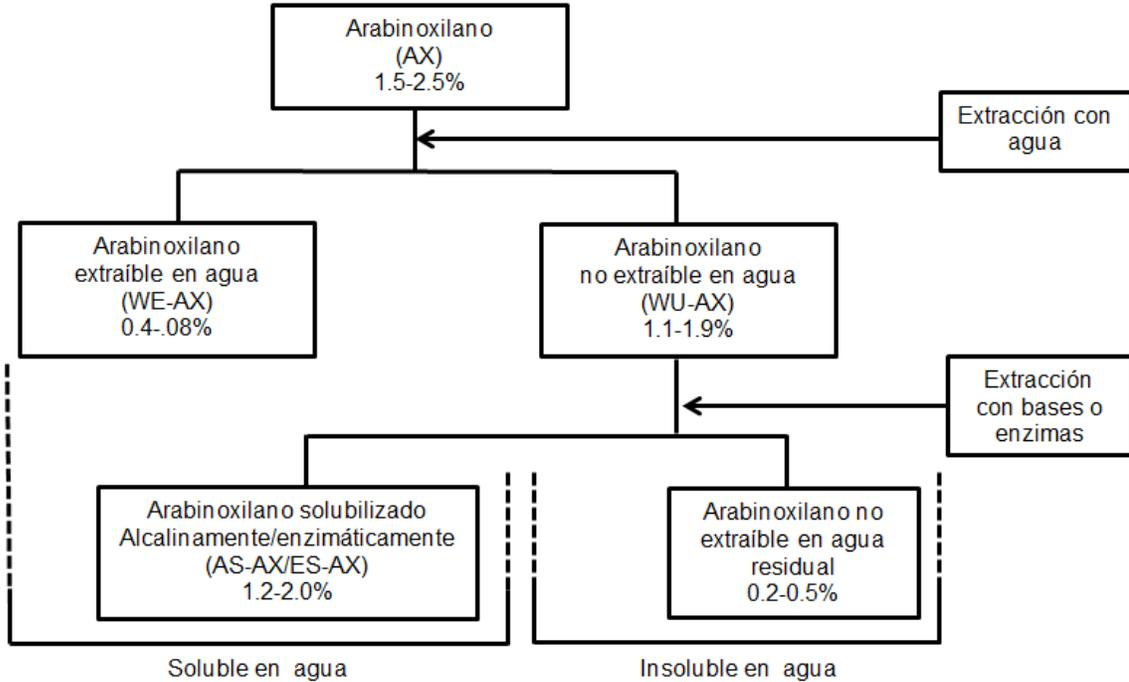


Figura 2. Clasificación de los AX en la harina de trigo de acuerdo a su extractabilidad (el porcentaje indicativo esta dado en el peso de la harina).

Un parámetro importante para el comportamiento de los AX es la relación arabinosa/xilosa (A/X), cuyo valor típico ronda de .5 a .6 para la población general de WE-AX en el trigo pero valores de .31 a 1.06 para las subfracciones WE-AX. En algunas ocasiones se han reportado arabinosa poliméricas como cadenas laterales y la posibilidad de cadenas laterales de xilosas también ha sido mencionada.

Los sustituyentes no se encuentran siempre distribuidos de la misma manera sobre la cadena de xilano. Se considera que los WE-AX poseen dos regiones alternantes. En las regiones fuertemente ramificadas, que constituye cerca de tres cuartas partes de las moléculas del AX, 3 de 7 residuos de xilosa son sustituidos, con un

alto nivel de disustitución. Cada 20 o 25 residuos las regiones fuertemente ramificadas son alternadas con regiones abiertas, pudiendo contener arriba de cinco o más residuos de xilosa no sustituidos consecutivamente (Courtin y Delcour, 2002).

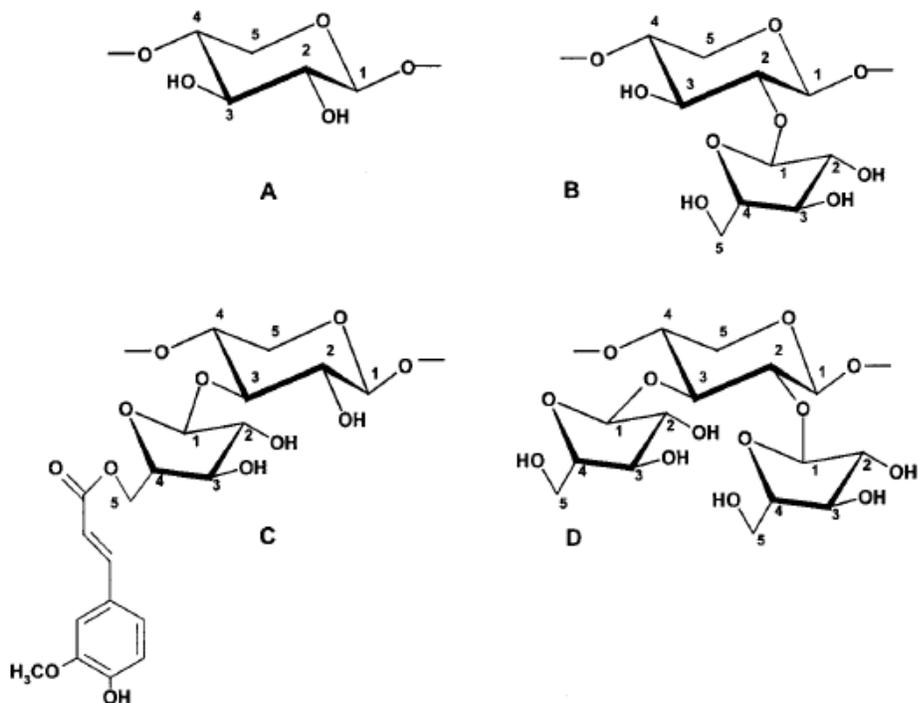


Figura 3. Elementos estructurales del AX: A) residuo de D-xilopiranosil, B y D) residuo de D-xilopiranosil sustituido con residuos de L-arabinoxilano, C) unión del ácido ferúlico al residuo de L-arabinofuranosil.

1.3.4 Lípidos

En la harina de trigo los lípidos pueden ser clasificados en lípidos asociados al almidón, que forman las dos terceras partes de los lípidos totales y que se pueden dividir en 90% lípidos polares y 10% lípidos no polares; y lípidos no asociados al almidón, que forman una tercera parte de los lípidos totales y pueden ser divididos en 60% lípidos no polares y 40% lípidos polares, siendo los lípidos no asociados al almidón los que afectan significativamente el proceso de panificación.

Los lípidos asociados al almidón se encuentran fuertemente unidos a los gránulos de almidón por lo que no afectan el procesamiento de la masa. Se piensa que los lípidos afectan positivamente la estabilización de los gases y las propiedades del manejo de la masa (Dornez, 2007; Roets, 2009).

La incorporación de lípidos a la masa del pan provoca un volumen final de pan más grande, una miga más suave, una corteza menos crujiente así como un aumento en la calidad de duración (Stauffer, 1993).

1.3.5 Enzimas

Enzimas como la α y β -amilasa, proteasas, lipasas, esterases, oxidasas y peroxidasas se encuentran naturalmente presentes en la harina de trigo (Kent y Evers, 1994). Estas enzimas endógenas al trigo tienen el potencial de afectar la calidad del trigo y el rendimiento en la fabricación del pan, pero además de la α -amilasa y otras enzimas en el trigo, su impacto es en gran parte desconocido (Veraverbeke y Delcour, 2002). Sin embargo, en vista a los grandes efectos observados por la adición de enzimas microbianas en los procesos de fabricación del pan, es razonable asumir que las enzimas asociadas al trigo pueden también ser funcionales y tener un impacto importante en la calidad de la fabricación del pan.

Las amilasas hidrolizan aleatoriamente los enlaces glicosídicos α -(1,4) del almidón, produciendo oligosacáridos de distintos tamaños (Roets, 2009). Los niveles de α -amilasa son rutinariamente cuantificados debido a los efectos que puede causar su variación, mientras que el efecto de la variación de la β -amilasa no es tan importante puesto se encuentra presente en todas las estadías de crecimiento del trigo en prácticamente la misma cantidad (Dornez, 2007).

Se cree que las α -amilasas afectan las propiedades de la masa en tres formas: por la formación de azúcares que pueden ser fermentados por la levadura, por el rompimiento de la fracción dañada del almidón, y por la formación de dextrinas (Wang, 2003). Niveles excesivos de esta enzima son perjudiciales para la calidad de fabricación del pan de trigo, caracterizándose por disminución del volumen, interior compacto y color de la corteza demasiado oscuro (Dornez, 2007).

Las proteasas pueden estar presentes en niveles relativamente pequeños en el trigo joven, pero sus niveles aumentan en el trigo maduro. Los efectos de las proteasas endógenas en la fabricación del trigo no son bien conocidos, pero bajos niveles de proteasas microbianas son a veces agregados durante la elaboración del pan para hacer a la masa más suave y extensible. Esto puede permitir una disminución en el tiempo de mezclado, mejorar las propiedades mecánicas y una mejor retención de gas. Niveles excesivos de actividad proteasa adicionada, en contraste, resulta en la pérdida de la estructura del gluten, permitiendo una disminución en la retención del gas en la masa y un colapso de la estructura de la miga del pan. Además, las proteasas pueden liberar los grupos amino que afectan el color y sabor a través de las reacciones de Maillard (Mathewson, 2000).

La información acerca de la funcionalidad de las endoxilanasas asociadas al trigo en la producción de pan y su contribución a las variaciones de la calidad del trigo es muy limitada. En vista del extensivo uso de las endoxilanasas microbianas en la fabricación del pan para mejorar el procesamiento y características del pan, no es imposible que las xilanasas asociadas al trigo también impacten en la calidad durante la fabricación del pan.

La hidrólisis de grasas por lipasas y la liberación de ácidos grasos durante el almacenamiento pueden provocar el deterioro y ranciedad del grano provocando efectos adversos en la calidad de la harina. Sin embargo, adicionar lipasas puede mejorar las propiedades reológicas de la masa así como la calidad del producto

horneado.

Además, el trigo contiene varios inhibidores de enzimas como inhibidores de alfa-amilasa, proteasas y endoxilanasas, que pueden afectar la funcionalidad de la encima y por lo tanto la calidad del trigo (Dornez, 2007).

1.4. Proceso de panificación y aditivos

El proceso de la elaboración del pan puede ser dividido en tres partes principales: amasado, fermentación y cocción (Keskin, 2003).

1.4.1 Amasado

El mezclado de la masa cumple dos funciones: homogenizar la distribución de los componentes del pan y conseguir, por medio del trabajo físico del amasado, las características plásticas de la masa (desarrollo del gluten), para poder así formar una estructura capaz de retener el gas disperso para una perfecta oxigenación (Mesas y Alegre, 2002; Keskin, 2003).

1.4.2 Fermentación

Una vez que se han mezclado la levadura y el resto de los ingredientes, empieza la fermentación de la masa. La levadura utiliza los azúcares y el aire (atrapado en la masa durante el amasado) para su reproducción (Hernández y col., 2003).

Los dos cambios principales que ocurren durante la fermentación son: la fermentación de carbohidratos en dióxido de carbono, alcohol, y pequeñas cantidades de otros componentes que actúan como precursores de sabor, y la modificación de la matriz de proteína para un desarrollo óptimo de la masa y que

permite una retención óptima de los gases durante la fase de cocción (Keskin, 2003).

1.4.3 Horneado

La etapa final en la producción de pan es un paso clave en el cual la pieza de masa es transformada en un producto brillante, poroso y listo para la digestión bajo la influencia de calor. Por los requisitos de calidad, la producción de pan requiere un proceso de cocción controlado y cuidadoso. Entre los parámetros que influyen la calidad del producto final se incluye la tasa y cantidad de calor aplicado, el nivel de humedad en la cámara de horneado y el tiempo de horneado (Therdthai y col., 2002).

Antes del horneado, la masa es cortada y se le da forma deseada. Cuando se corta, se escapa parte del gas que se ha generado dentro de la masa, siendo necesario dejarla en reposo para que se produzca más dióxido de carbono. Una vez que el pan ha crecido, se procede a hornearlo.

El horneado se lleva a cabo de veinte a cuarenta minutos, a una temperatura entre 235 y 260°C, aunque la temperatura en el interior del pan no excede los 100°C, excepto en la superficie donde es mayor y se produce un endurecimiento por desecación (Hernández y Col., 2003). Las reacciones que se llevan a cabo durante el horneado son los cambios físicos y los cambios químico/bioquímicos. Estas reacciones deben tomar lugar en orden, a una temperatura específica, en el tiempo correcto y en una atmosfera apropiada. Estas reacciones son: formación de la cubierta, expansión del gas, reducción de la solubilidad del gas, evaporación del alcohol, acción de la levadura, formación del dióxido de carbono, gelatinización del almidón, desnaturalización del gluten, caramelización de los azúcares y reacciones de coloración (Keskin, 2003).

1.4.4 Aditivos

Debido a los cambios en la industria de la panadería y la siempre creciente demanda por productos más naturales, las enzimas han ganado una gran importancia en la panificación, donde mejoran la calidad de la masa y el pan, mejorando la flexibilidad de la masa, la calidad de pan, la estabilidad del volumen de la hogaza y la estructura de la miga. Las enzimas como las proteasas, xilanasas y celulasas directa o indirectamente mejoran la calidad del pan (Butt y col., 2008).

Durante las etapas de elaboración del pan, la acción de las enzimas es muy importante, ya que actúan sobre la calidad, características y conservación del producto final. Las enzimas proceden de la propia harina, de la levadura utilizada en el proceso de panificación y de preparados comerciales adicionados. Estas enzimas actúan sobre los diferentes componentes de la harina de trigo hasta su desnaturalización térmica durante su cocción. El tipo de enzima a utilizar y su dosis depende de diversos factores, tales como las características de la harina que sea utilizada, el proceso de producción y condiciones de las que se lleva a cabo y las características del producto final que se desea obtener (Lascano, 2010).

Durante un tiempo se creyó que las amilasas eran las únicas enzimas que podían usarse en la industria de la panificación. Esta creencia cambio radicalmente desde la introducción de las hemicelulasas y las enzimas lipolíticas. Existiendo muchas más enzimas, tal y como se muestra en el Cuadro 1, que juegan papeles importantes en determinadas partes del proceso.

1.5 Enzimas xilanolíticas

La completa degradación del xilano requiere de la acción de una gran variedad de enzimas hidrolíticas (Pastor y col., 2007). Las enzimas que rompen la hemicelulosa

son llamadas hemicelulasas. Son definidas y clasificadas de acuerdo al sustrato sobre el cual actúan, siendo la enzima más importante la endo-1.4-xilanasa (EC 3.2.1.8), que inicia la conversión del xilano en xilooligosacáridos (Butt y col., 2008).

Cuadro 1. Enzimas sugeridas para la mejora del pan y de la harina (Popper, 2005).

Enzima	Efecto pretendido
α -amilasa, fungal	Suministro de energía para la levadura
α -amilasa, bacteriana	Licuefacción
Amiloglucosidasa	Suministro de energía, color, sabor
Glucotransferasa	Retención de agua
Celulasa	Retención de agua
Esterasa de ácido ferúlico y cumárico	Estructura de la masa, retención de agua
Glutación oxidasa	Refuerzo de las proteínas
Glicolipasa, galactolipasa	Estabilidad de la masa y rendimiento de volumen
β -glucanasa	Estructura, licuefacción
Glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, hexosa oxidasa	Refuerzo de las proteínas
Hemicelulasa, xilanasa, pentosanasa	Estructura de la masa, retención de agua, rendimiento de volumen
Lacasa, polifenol oxidasa	Reforzamiento de la masa
Lipasa	Sabor, emulsificación estabilidad de la masa y rendimiento de volumen
Lipooxigenasa, lipooxidasa	Estructura de la masa, decoloración
Exopeptidasa	Color, sabor
Peroxidasa	Reforzamiento de las proteínas
Fosfolipasa	Estructura porosa y rendimiento de volumen
Proteasa, proteinasa	Relajación de las proteínas, licuefacción
Pululanasa	Estructura, retención de agua
Sulfidril oxidasa	Reforzamiento de las proteínas
Sulfidril transferasa	Reforzamiento de las proteínas

1.5.1 Clasificación

Debido a la complejidad y heterogeneidad de las xilanasas, existe una limitación al clasificar estas enzimas por solo la especificidad del sustrato. En un principio, las xilanasas se clasificaban en dos grupos según sus propiedades químicas: (i) masa molecular baja, menor a 30 kDa, y pl básico, y (ii) peso molecular alto, mayor a 30 kDa, y pl ácido. Sin embargo, muchas xilanasas, en particular de hongos, no pueden ser clasificadas por este sistema por lo que posteriormente se creó otra clasificación siendo agrupadas colectivamente como glucan-hidrolasas (EC 3.2.1) (Butt y col., 2008; Bastawde, 1992).

Las xilanasas pueden ser más fácilmente clasificadas dentro de dos grupos principales: los que actúan sobre la cadena principal de xilosa, y las que escinden las cadenas secundarias. 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 -L-arabinofuranosidasas, α -D-glucuronidasas, acetil-xilano esterasas, ácido ferúlico esterasas y ácido p-coumarico esterasas (Figura 4) (Pastor y col., 2007).

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

Estas enzimas actúan aleatoriamente en el xilano para producir grandes cantidades de xilooligosacáridos de cadenas de distintas longitudes. Existen cuatro tipos:

A) Endoxilanasas no liberadoras de arabinosa. Estas no pueden actuar en puntos de ramificación de enlaces iniciados en L-arabinosil β -(1 \rightarrow 4) y producen solo xilobiosa y xilosa como sus productos finales mayoritarios. Estas enzimas pueden romper xilooligosacáridos tan pequeños como la xilobiosa.

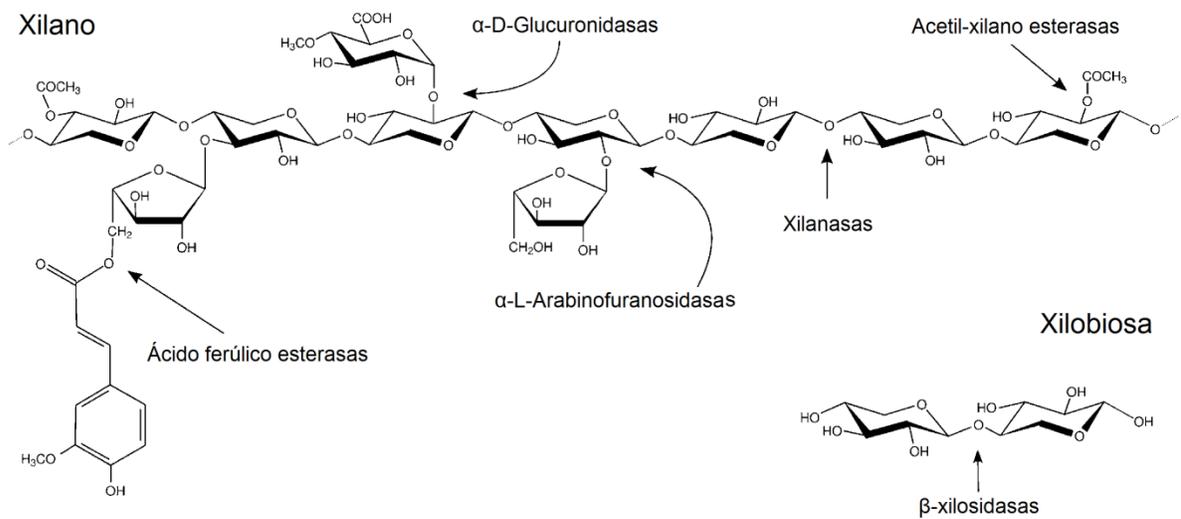


Figura 4. Estructura del xilano y los sitios de ataque por las enzimas xilanolíticas.

B) Endoxilanasas no liberadoras de arabinosa. Estas no pueden romper los puntos de ramificación en α -(1→2) y α -(1→3) y produce principalmente xilooligosacáridos más largos que la xilobiosa. Estas endoxilanasas no tienen acción sobre la xilotriosa y xilobiosa.

C) Endoxilanasas liberadoras de arabinosa. Estas pueden romper las cadenas de xilano en los puntos de ramificación y producir principalmente xilobiosa, xilosa y arabinosa.

D) Endoxilanasas liberadoras de arabinosa. Estas pueden hidrolizar los puntos de ramificación y producir xilooligosacáridos de tamaño intermedio y arabinosa (Bastawde, 1992).

1.5.1.2 β -xilosidasa o xilobiasa (EC 3.2.1.37)

Cataliza la hidrólisis de los 1,4- β -xilooligosacáridos removiendo los residuos sucesivos de D-xilosa del extremo no reductor de la cadena de xilano.

1.5.1.3 α -arabinofuranosidasas (EC 3.2.1.55)

Hidrolizan los grupos terminales no reductores α -L-arabinofuranosil de arabinanos, arabinoxilanos y arabinogalactanos.

1.5.1.4 α -D-glucoronidasas (EC 3.2.1.1)

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

1.5.1.5 Esterasas

La hidrolisis completa de los glucoronoxilanos naturales requiere de esterazas para remover los ácidos acéticos y fenólicos unidos. Las esterazas rompen las uniones de xilosa con ácido acético [acetil xilan esteraza (EC 3.1.1.6)], las cadenas laterales de residuos de arabinosa con ácido ferúlico [feruloil esteraza (EC 3.1.1.73)] y cadenas laterales de residuos de arabinosa a ácido p-coumarico (p-coumaroil esteraza) (Subramaniyan y Prema, 2002).

1.5.2 Microorganismos productores de xilanasas

La degradación del xilano se extiende ampliamente entre los microorganismos saprofiticos, incluyendo bacteria y fungi, así como en los microorganismos del rumen, que poseen sistemas de enzimas xilanolíticas completos, un ejemplo de algunos organismos productores de xilanasas y sus características se muestran en la Cuadro 2.

Generalmente, las xilanasas son inducidas en la mayoría de los microorganismos durante su crecimiento en substratos que contienen xilano. Pequeños

oligosacáridos solubles liberados del xilano por la acción de bajos niveles de enzimas producidas constitutivamente son transportados dentro de las células donde inducen la expresión de xilano.

Cuadro 2. Características de algunas xilanasas producidas por diferentes microorganismos (Butt y col, 2008).

Microorganismo	Masa molecular/kDa	pH óptimo	Temperatura óptima/ °C
<i>Arcrophialophora nainiana</i>	22	7.0	55
<i>Aspergillus awamori</i>	39	5.5-6.0	40-55
<i>Aspergillus nidulans</i>	34	6.0	56
<i>Aspergillus nidulans</i> KK-99	nd	8.0	55
<i>Aspergillus oryzae</i>	35	5.0	60
<i>Aspergillus sojae</i>	32.7	5.0-5.5	50-60
<i>Aspergillus terreus</i>	nd	7.0	50
<i>Aspergillus terreus</i>	nd	4.5	45
<i>Myceliophthora sp.</i>	53	6.0	75
<i>Penicillium capsulatum</i>	22	3.48	48
<i>Streptomyces sp.</i>	24.5, 37.5, 38	6.0-8.0	55-60
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	24.7	6.0-6.5	70
<i>Trichoderma harzianum</i>	20	5.0	50
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	37.7	5.0-6.0	45
<i>Trichoderma viride</i>	22	5.0	53

nd= no determinado

Muchos de los microorganismos degradadores de xilano producen una multiplicidad de xilanasas con especificidades diferentes pero que se traslapan. Esto ha sido evidenciado por importantes productores de xilanasas como *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Streptomyces* y *Bacillus* entre otros. La multiplicidad de las xilanasas puede provenir de los diferentes procesos post-transcripcionales del mismo producto génico. La producción de un sistema de multienzimas de xilanasas, en el cual cada enzima tiene una función específica, representa una estrategia para conseguir una eficiente hidrólisis del xilano (Pastor y col., 2007).

Ha habido un incremento en el uso de preparados de xilanasas con un pH óptimo

≤ 5.5 producidas por hongos. El pH óptimo de la degradación del xilano es alrededor de 5 en la mayoría de las xilanasas fúngicas, aunque son estables a un pH entre 3 y 8. La mayoría de los hongos producen xilanasas, que toleran temperaturas bajo los 50°C. En general, con raras excepciones, los hongos han sido reportados como productores de xilanasas teniendo un cultivo inicial con un pH menor a 7. Sin embargo, es diferente en el caso de las bacterias. El pH óptimo de las xilanasas bacterianas es por lo general ligeramente más alto que el pH óptimo de las xilanasas fúngicas.

En la mayoría de las aplicaciones industriales el uso de las xilanasas fúngicas resulta menos adecuado, debido al pH bajo requerido para su crecimiento y actividad óptima requiere pasos adicionales en las etapas posteriores. (Subramaniyan y Prema, 2002).

1.6 Importancia de las xilanasas en la industria de la panificación

La aplicación de enzimas xilanólíticas se ha incrementado en las últimas décadas debido a sus efectos potenciales durante la elaboración del pan. Las enzimas hidrolizantes de almidón y carbohidratos no almidonosos son comúnmente usadas en la industria de la panificación como mejoradores de las propiedades reológicas de la masa, el volumen específico del pan y la firmeza de la hogaza.

El efecto benéfico de las xilanasas está relacionado con la transformación de las hemicelulosas insolubles en agua a su forma soluble y atribuido al resultante aumento de la viscosidad, que se ve reflejado en la disminución de la firmeza e incremento del volumen de la masa, y la creación de hogazas más finas y uniformes (Courtin y Delcour, 2001; Butt y col, 2008).

De acuerdo con lo reportado por Maat y col. en 1992, el efecto positivo de las xilanasas en el volumen del pan se debe a la redistribución del agua de la fase

de pentosano a la fase de gluten. El incremento en el volumen de la fracción de gluten aumenta su extensibilidad, lo que se traducirá en un mejor crecimiento en el horno.

Durante el horneado, el efecto de mejora de pentosanos sobre el volumen del pan se ha asociado con una mejor retención de gas, probablemente debido a la acción de la enzima en la reducción de la viscosidad del almidón gelificante y permitiendo una mayor expansión en el horno antes de la inhibición de las enzimas y la desnaturalización de la proteína (Martínez y Jiménez, 1997).

La figura 5 muestra una representación esquemática de los efectos de las endoxilanasas en la panificación donde el modelo (a) representa una situación de control sin endoxilanasas añadidas. Existe poca estabilización en las películas líquidas por los WE-AX y un impacto negativo en las celdas de gas de WU-AX. El modelo (b) representa la situación que ocurre cuando se añade una endoxilanasas con selectividad por los WU-AX. Los WU-AX se solubilizan y aumenta la cantidad de WE-AX/ES-AX. La coalescencia se retrasa. El modelo (c) representa la situación cuando una xilanasas con selectividad por WE-AX se añade. Los WE-AX son ampliamente hidrolizados, lo que resulta en la disminución de la estabilización y el aumento de la coalescencia en las celdas de gas en comparación con la situación de control, generando un efecto perjudicial permanente (Courtin y Delcour, 2001).

Otro efecto beneficioso sobre el pan es la acción anti-envejecimiento durante el almacenamiento, siendo esta acción no totalmente clara. La acción de mejora de la xilanasas puede atribuirse principalmente a la hidrólisis de los polisacáridos de la pared celular del grano de trigo. Los monosacáridos y oligosacáridos resultantes de la acción de la enzima podría afectar el balance de agua y podrían interferir con la interacción proteína-almidón durante el almacenamiento pan, de la misma manera como dextrinas específicas han sido descritas como interferentes en la retrogradación de amilopectina (Haros y col., 2002).

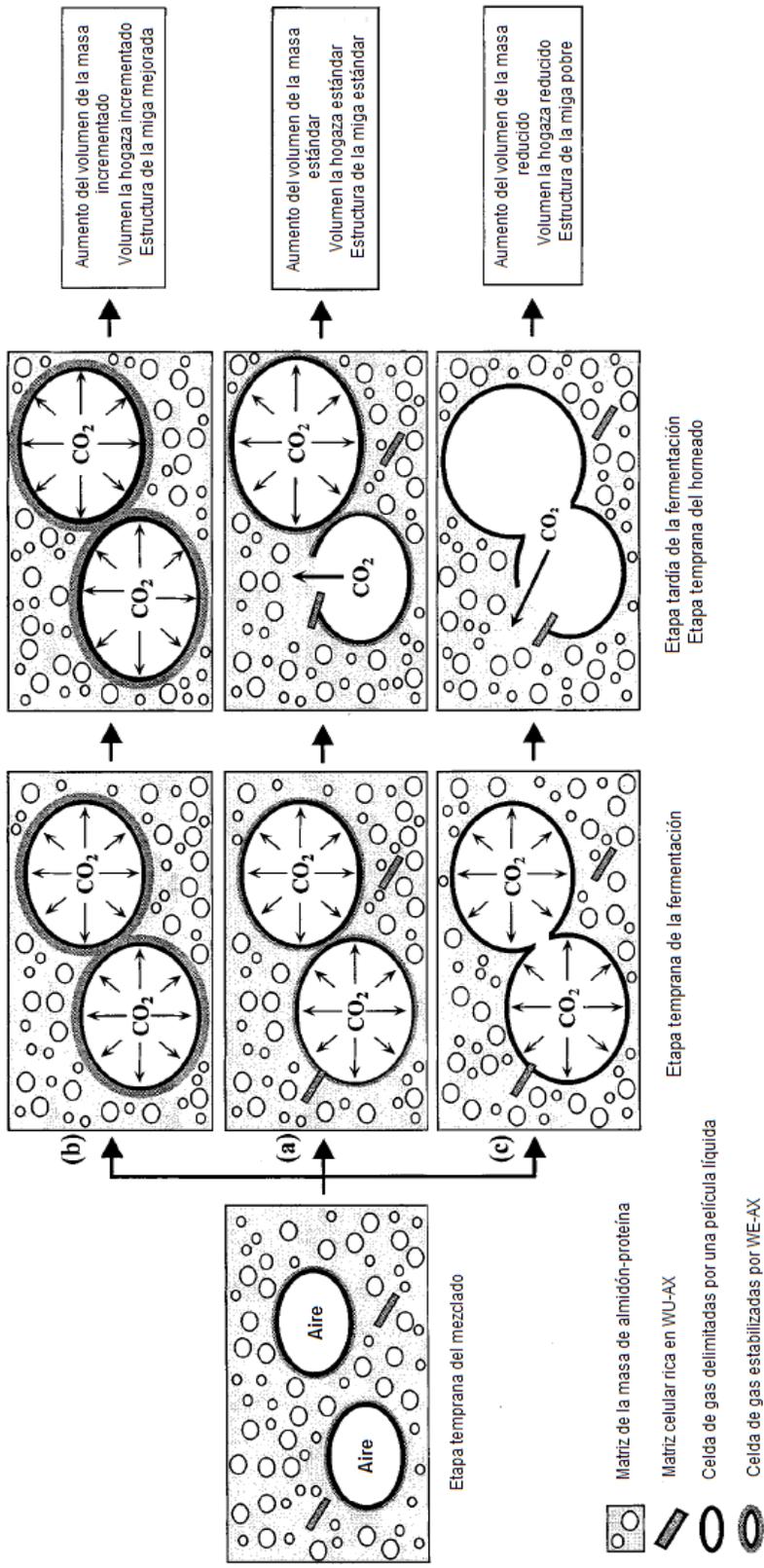


Figura 5. Mecanismo detrás de la funcionalidad de las endoxilanasas en la panificación (Courtin y Delcour, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Análisis de la actividad de diferentes xilanasas sobre harina de trigo para panificación.

2.2 Objetivos específicos

- Identificación de los xilooligosacáridos liberados por la acción de xilanasas estándares sobre arabinoxilano puro.
- Cinética de la degradación de arabinoxilano puro por la acción xilanasas estándares.
- Identificación y cuantificación de los xilooligosacáridos liberados por la acción de xilanasas estándares sobre harina de trigo a diferentes dosis y tiempos.
- Identificación de los xilooligosacáridos liberados por la acción de xilanasas comerciales sobre arabinoxilano puro.
- Identificación y cuantificación de los xilooligosacáridos liberados por la acción de xilanasas comerciales para panificación sobre harina de trigo.

3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales

3.1.1 Enzimas

Como estándares para la actividad xilanasa se utilizaron las xilanasas de *Bacillus stearothermophilus T6* (Cat No. E-XYNBS), *Thermotoga maritima* (Cat No. E-XYLATM), microorganismos del rumen (Cat No. E-XYRU6), *Trichoderma longibrachiatum* (Cat No. E-XYTR3) y *Aspergillus niger* (Cat No. E-XYAN4). Todas las enzimas utilizadas como estándares se compraron con Megazyme.

Las enzimas de uso comercial para panificación fueron proporcionadas por Granotec México.

3.1.2 Sustratos

Como sustratos de composición conocida se utilizó el arabinoxilano (Megazyme, Cat No. P-WAXYM).

La harina de trigo virgen utilizada como sustrato fue suministrada por Granotec México.

3.1.3 Estándares

Los estándares que se utilizaron en la Cromatografía en Capa Fina (TLC) xilobiosa (Cat No. O-XBI), xilotriosa (Cat No. O-XTR), xilotetraosa (Cat No. O-XTE), xilopentaosa (Cat No. O-XPE), xilohexaosa (Cat No. O-XHE) y arabinoxilano (Cat

No. P-WAXYM) se compraron con Megazyme y los estándares glucosa, arabinosa (Cat No. A3256), galactosa (Cat No. G0750) y manosa (Cat No. 63582) fueron adquiridos con Sigma-Aldrich.

3.1.4 Material cromatográfico

Para la cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography TLC). Se utilizaron placas de sílica gel 60 F254 marca MERCK.

3.2 Métodos

3.2.1 Preparación de los sustratos

Cada sustrato se preparó en buffer de citrato-fosfato (50 mM) correspondiente al pH óptimo para cada enzima (Cuadro 3) a una concentración de 10 mg/ml para el arabinoxilano y 200 mg/ml para cada tipo de harina.

3.2.2 Ensayos enzimáticos

3.2.2.1 Hidrólisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas

El ensayo de degradación de arabinoxilano se realizó en muestras de 235 μ l de arabinoxilano (10 mg/ml), a las cuales se les añadió 47 μ l con una concentración de 45 U/ml de una de las enzimas xilanasas a probar. La reacción específica se llevó a cabo por 10 minutos con la temperatura y pH óptimos para cada enzima de acuerdo con los datos de la cuadro 3. La duración de la reacción correspondió a 10 minutos debido a que este es el tiempo máximo que se utiliza para la etapa de mezclado, etapa donde actúa la xilanasas, durante la panificación.

La reacción enzimática se detuvo agregando 1128 µl de etanol absoluto a las muestras para conseguir una concentración final de etanol del 80%; posteriormente se centrifugó a 16000 x g, a 4°C por 10 minutos. Este procedimiento, además, facilitó la separación de los monosacáridos y oligosacáridos producidos en la reacción enzimática. Los sobrenadantes se recuperaron y se almacenaron a -20°C para la posterior determinación de azúcares por TLC.

Cuadro 3. Información de las enzimas utilizadas como estándar. Los datos se obtuvieron de la hoja de información de cada enzima.

Enzima	Organismo	Actividad	Temperatura optima	pH optimo
endo-1,4-β-Xilanasa	<i>Bacillus stearothermophilus</i> T6	Endohidrólisis de los enlaces (1->4)-B-D-xilosidicos en el xilano	70°C	6.5
endo-1,4-β-Xilanasa	<i>Thermotoga maritima</i>	Endohidrólisis de los enlaces (1->4)-B-D-xilosidicos en el xilano	80°C	5
endo-1,4-β-Xilanasa	Microorganismos del rumen	Endohidrólisis de los enlaces (1->4)-B-D-xilosidicos en el xilano	55°C	5.5-6.5
endo-1,4-β-Xilanasa	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Endohidrólisis de los enlaces (1->4)-B-D-xilosidicos en el xilano	50°C	6
endo-1,4-β-Xilanasa	<i>Aspergillus niger</i>	Endohidrólisis de los enlaces (1->4)-B-D-xilosidicos en el xilano	60°C	4.5

3.2.2.2 Cinética de la hidrólisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas

El ensayo de degradación se llevó a cabo de la misma manera que se especifica en el punto 3.2.2.1, con la excepción de que se realizaron muestreos cada dos minutos durante los 10 minutos de reacción para la posterior determinación de azúcares por TLC.

3.2.2.3 Análisis de los cambios estructurales de la harina de trigo por efecto de las xilanasas a diferentes dosis y tiempos.

El ensayo de degradación de los arabinoxilanos de la harina de trigo se realizó en muestras de 235 µl de harina de trigo (200 mg/ml), a las cuales se les añadió 47 µl, con una concentración de 45 U/ml para la primera prueba y una concentración de 90 U/ml para la segunda, Las enzimas utilizadas para esta prueba fueron las de *T. maritima* y *T. longibrachiatum*. La reacción específica se llevó a cabo por 10 minutos tomándose muestras cada dos minutos durante la reacción, a un pH de 5.0 para la primera enzima y un pH de 6.0 para la segunda. Ambas reacciones se llevaron a cabo a 50°C para evitar la gelificación del almidón

La reacción enzimática se detuvo según la metodología indicada en el punto 3.2.2.1. Los sobrenadantes se recuperaron y almacenaron a -20°C para la posterior determinación de azúcares por TLC y cuantificación de azúcares totales por el método fenol-ácido sulfúrico.

3.2.2.4 Hidrólisis enzimática de harina de trigo por efecto de las xilanasas de diferentes proveedores

El ensayo de degradación de los arabinoxilanos de la harina de trigo se realizó en muestras de 235 µl de harina de trigo (200 mg/ml), a las cuales se les añadieron

47 μ l a una concentración de enzima de .015 g/ml de una de las enzimas comerciales proporcionadas por Granotec: Pentopan Mono, Pentopan Plus, HPI FAX y Bakezyme HSP. La reacción específica se llevó a cabo por 10 minutos, a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ y pH 6, para simular las condiciones a las que las enzimas son expuestas durante el amasado.

La reacción enzimática se detuvo según la metodología indicada en el punto 3.2.2.1. Los sobrenadantes se recuperaron y almacenaron a 4°C para la posterior determinación de azúcares por TLC y cuantificación de azúcares totales por el método fenol-ácido sulfúrico.

3.2.4 Análisis cualitativo de xilosacáridos por TLC.

Se prepararon como estándares muestras de diferentes azúcares a una concentración de 10 mg/ml y se diluyeron a una proporción 1:4 con etanol absoluto. Los estándares utilizados fueron: glucosa, manosa, maltosa, arabinosa, galactosa y xilooligosacáridos de 1 a 6 carbonos. A partir de la placa obtenida se calcularon los factores de retención de cada uno de los azúcares.

Para cada muestra se tomaron 85 μ l de cada triplicado y se mezclaron a un volumen final de 255 μ l, posteriormente estas muestras se evaporaron en baño seco a $95\pm 2^{\circ}\text{C}$ de 10 a 12 minutos. Las muestras se resuspendieron en 50 μ l de etanol absoluto y se vortexearon por 5 minutos para su homogenización.

Para las pruebas se aplicaron 2 μ l de muestra a las placas de cromatografía, previamente marcada, y se separaron con una mezcla acetonitrilo/agua (80:20 v/v) como eluyente en una cámara de saturación. Los azúcares se detectaron rociando la placa con una solución recién preparada de 10 ml de stock de revelado (1 g difenilamina y 1 ml de anilina disueltos en 100 ml de acetona) con 1 ml de ácido

orto-fosfórico. Seguido por calentamiento de las placas a 120°C hasta la aparición de color (Zverlov y col., 2005).

En cada prueba se aplicó una mezcla de estándares de xilooligosacáridos de 1 a 6 carbonos a una concentración conocida.

3.2.5 Análisis cuantitativo del contenido de xilooligosacáridos por el método de fenol-ácido sulfúrico.

A partir de un estándar de 1g/L de xilano se preparó una curva de calibración de 0 a 100 mg/ml usando como solvente etanol al 80%.

Para las muestras de hidrolisis enzimática, se probaron diluciones para encontrar la concentración óptima para la prueba, resultando esta en 1:13, diluyendo con etanol al 80%.

Para la cuantificación de azúcares se colocaron .5 ml de cada muestra en tubos de ensayo de vidrio. Se adicionaron .3 ml de una solución de fenol al 5% y se agregó 1.8 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Las muestras se dejaron enfriar por aproximadamente 30 minutos y se midieron en el espectrofotómetro en una celda de cuarzo a 480nm contra el blanco (Dubois y col., 1956).

4. RESULTADOS

4.1 Determinación del frente relativo de monosacáridos y xilooligosacáridos estándar

Se preparó una placa de estándares para conocer el frente relativo (Rf) cada uno de los estándares, tanto xilooligosacáridos como otros azúcares simples. Se aplicaron a la placa 4 µl de una solución de 10 mg/ml en buffer fosfato-citrato (50mM, pH 6) de cada estándar previamente diluido con etanol absoluto en una proporción 1:4 (v: v).

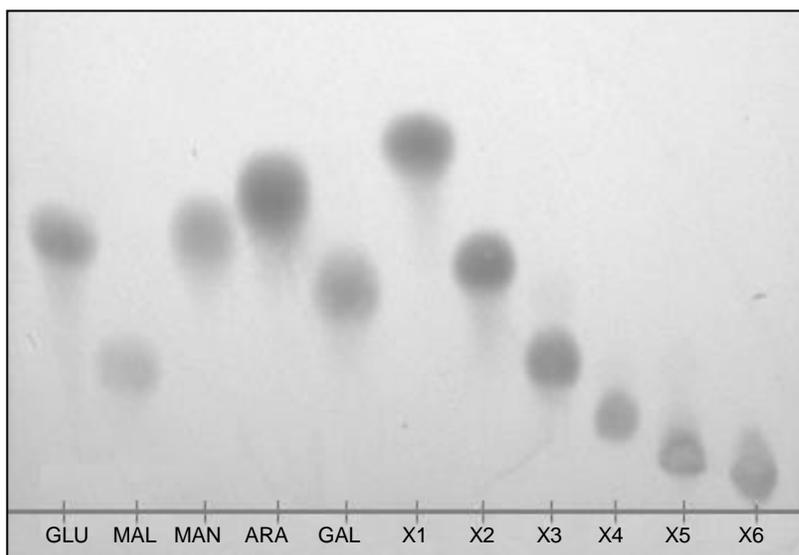


Figura 6. TLC de azúcares estándares. Los estándares utilizados fueron glucosa (GLU), maltosa (MAL), manosa (MAN), arabinosa (ARA), galactosa (GAL), xilosa (X1), xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentaosa (X5) y xilohexaosa (X6).

En la figura 6 se muestra el corrimiento de mono y xilooligosacáridos estándares, se muestra un corrimiento diferencial para cada uno de los estándares. Los xilooligosacáridos presentan corrimiento que depende de su masa molecular tal como era de esperarse. Los Rf obtenidos se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 4. Factor de retención (Rf) de los azúcares estándar. El Rf de cada estándar se calculó como: $Rf = \text{distancia recorrida por el soluto} / \text{distancia recorrida por el solvente}$.

Estándar	Peso Molecular	Rf
Glucosa	180.16	0.37647059
Maltosa	342.3	0.2
Manosa	180.16	0.38823529
Arabinosa	150.13	0.43529412
Galactosa	180.16	0.30588235
Xilosa	150.13	0.50588235
Xilobiosa	282.24	0.34117647
Xilotriosa	414.36	0.21176471
Xilotetraosa	546.47	0.11764706
Xilopentaosa	678.59	0.07058824
Xilohexaosa	810.71	0.04705882

4.2 Determinación de la concentración para la aplicación del estándar mezclado de xilooligosacáridos.

Para decidir la concentración a la cual se aplicarían los estándares de xilooligosacáridos se preparó una mezcla de xilosa (X1), xilobiosa (X2), xilotriosa (X3), xilotetraosa (X4), xilopentaosa (X5) y xilohexaosa (X6). Se preparó una mezcla a partir de soluciones stock de xilooligosacáridos (20 mg/ml) diluidos con etanol absoluto en una proporción 1:4 (v/v) con concentraciones finales de 2mg/ml para xilosa y xilobiosa y de 4 mg/ml para xilotetraosa, xilopentaosa y xilohexaosa. La mezcla resultante se diluyó 5:1, 2:1, 3:3 y 1:4 (mezcla: etanol) y se aplicaron por duplicado a diferente volumen (2 y 4 μ l) a la placa de cromatografía.

En la figura 7 se muestra el corrimiento de las diferentes concentraciones de

mezclas de xilooligosacáridos. Se puede observar que los carriles 1 a 5 con aplicaciones de muestra 4 μ l no dan una buena definición de las bandas, mientras que los carriles 6 a 10 con aplicaciones de muestra de 2 μ l presentan una excelente definición excepto para el carril 10, donde se observa una saturación del sistema.

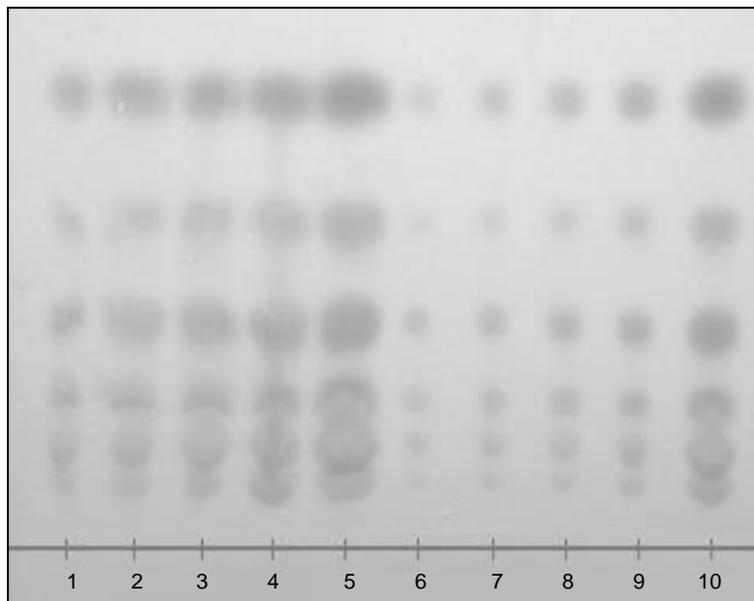


Figura 7. Estándares de xilooligosacáridos a diferentes concentraciones. Del carril 1 a 5 aplicaciones de 4 μ l, del carril 6 a 10 aplicaciones de 2 μ l. Carriles 1 y 6: dilución 1:4; carriles 2 y 7: dilución 3:3; carriles 3 y 8: dilución 2:1; carriles 5 y 10: dilución 5:1.

A partir de esta placa de cromatografía de los xilooligosacáridos (Figura 7) se decidió que la aplicación de muestra a las placas sería de 2 μ L a una dilución correspondiente a 3:3 para cada placa. Esta placa también permitió definir un límite de detección aproximado de .08 mg/ml para xilosa y xilobiosa, y de .16mg/ml para los xilooligosacáridos de 4 a 6 carbonos.

Además es importante observar que a mayor volumen de muestra y mayor concentración de azúcares las manchas se ven deformadas del carril 2 al 5 y del 9 al 10, es posible observar que las manchas correspondientes a xilotetraosa

forma una línea convexa hacia la dirección de la corrida del solvente, mientras que xilopentaosa y xilohexaosa forman manchas cóncavas con respecto a la dirección de la corrida del solvente. También se observa que a mayor concentración estos dos xilooligosacáridos disminuyen su distancia recorrida y la distancia entre ellos se vuelve menos notoria. De igual manera, a mayor concentración se observa un barrido entre la xilopentaosa y xilotetraosa que podría parecer la presencia de otro azúcar, por lo que resulta importante analizar con cuidado las placas de TLC de las reacciones enzimáticas tomando en cuenta estos criterios.

4.3 Variabilidad de los Rf de los xilooligosacáridos

Para poder conocer la variabilidad de los Rf de cada uno de los xilooligosacáridos estándar se prepararon diversas placas en las cuales se aplicaron 2uL de un estándar mezclado utilizando la dilución ya mencionada. Los resultados se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Frentes relativos de los diferentes xilooligosacáridos utilizados como estándares en diferentes pruebas.

Estándar	Rf1	Rf2	Rf3	Rf4	Rf5	Rf6	Rf7	Rf8	Rf9	Rf10	Rf11	Desviación estándar
Xilosa	0.506	0.533	0.571	0.544	0.578	0.511	0.556	0.567	0.578	0.589	0.544	0.0275
Xilobiosa	0.341	0.389	0.440	0.400	0.433	0.356	0.411	0.411	0.417	0.433	0.400	0.0313
Xilotriosa	0.212	0.267	0.330	0.278	0.311	0.244	0.289	0.289	0.300	0.311	0.267	0.0335
Xilotetraosa	0.118	0.178	0.220	0.178	0.211	0.156	0.189	0.194	0.200	0.211	0.189	0.0290
Xilopentaosa	0.071	0.122	0.165	0.122	0.144	0.111	0.133	0.117	0.111	0.144	0.111	0.0245
Xilohexaosa	0.047	0.078	0.110	0.078	0.089	0.067	0.100	0.078	0.078	0.100	0.067	0.0180

Debido a que la desviación estándar de los Rf obtenidos para xilooligosacáridos varia de 0.018 - 0.033 cm en diferentes placas, se determinó que en este caso el valor del Rf no resulta ser una herramienta definitiva para la identificación de los azúcares, sobre todo aquellos cuyo Rf tienen una diferencia entre ese rango de distancia. Por lo tanto, se decidió incluir una mezcla de estándares de xilooligosacáridos en cada prueba.

4.4 Hidrolisis de arabinoxilano puro por diferentes xilanasas estándares.

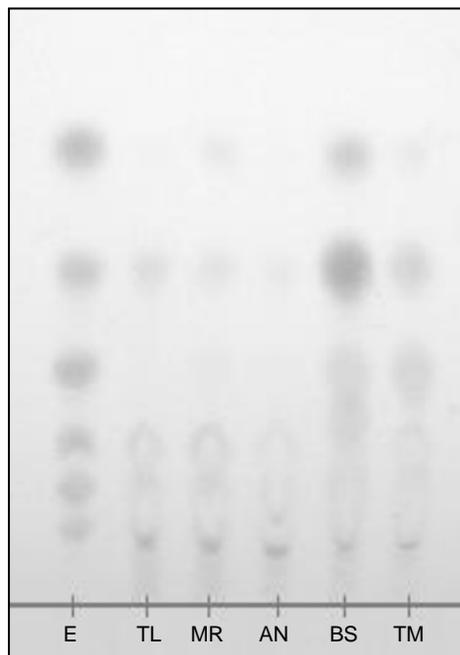


Figura 8. Hidrólisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas. Las xilanasas utilizadas: *Trichoderma longibrachiatum* (TL), microorganismos del rumen (MR), *Aspergillus niger* (AN), *Bacillus stearothermophilus* T6 (BS) y *Thermotoga maritima* (TM), mezcla de estándares (E).

La figura 8 muestra los resultados de la hidrólisis de arabinoxilano puro con las diferentes enzimas utilizadas como enzimas estándar, tras 10 minutos de actividad. A simple vista se observa que la enzima que liberó un mayor perfil de arabinoxilanos menores a tres carbonos corresponde a la enzima BS, sin embargo en este perfil también se observa un perfil correspondiente a un azúcar desconocido, que no corresponde a ninguno de los estándares de azúcares

utilizados tanto en esta placa, como en la placa de estándares de sacáridos (Figura 6) La relación de los xilooligosacáridos obtenidos por cada enzima se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Relación de los xilooligosacáridos obtenidos por la hidrólisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas.

Enzima	X1	X2	X3	X4	X5	X6
TL		✓		✓		✓
MR	✓	✓		✓		✓
AN		✓		✓	✓	✓
BS	✓	✓	✓			✓
TM	✓	✓	✓	✓		✓

4.5 Cinética de la hidrolisis enzimática del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas estándares

Una vez realizada la prueba de hidrolisis de los diez minutos se procedió a la identificación de los xilooligosacáridos liberados respecto al tiempo. La figura 9 muestra las diferentes placas obtenidas de cada una de las enzimas que se probaron, observándose a todos los tiempos para BS la mancha no identificada antes mencionada. Se observa en cada caso el aumento gradual de la intensidad de alguna de las manchas, sin embargo los diferentes xilooligosacáridos liberados aparecen en la placa a partir del minuto 2, lo que sugiere que la liberación de los xilooligosacáridos continua de una manera progresiva para cada enzima durante los primero minutos de la prueba, y no se liberan xilooligosacáridos diferentes a los iniciales durante la digestión.

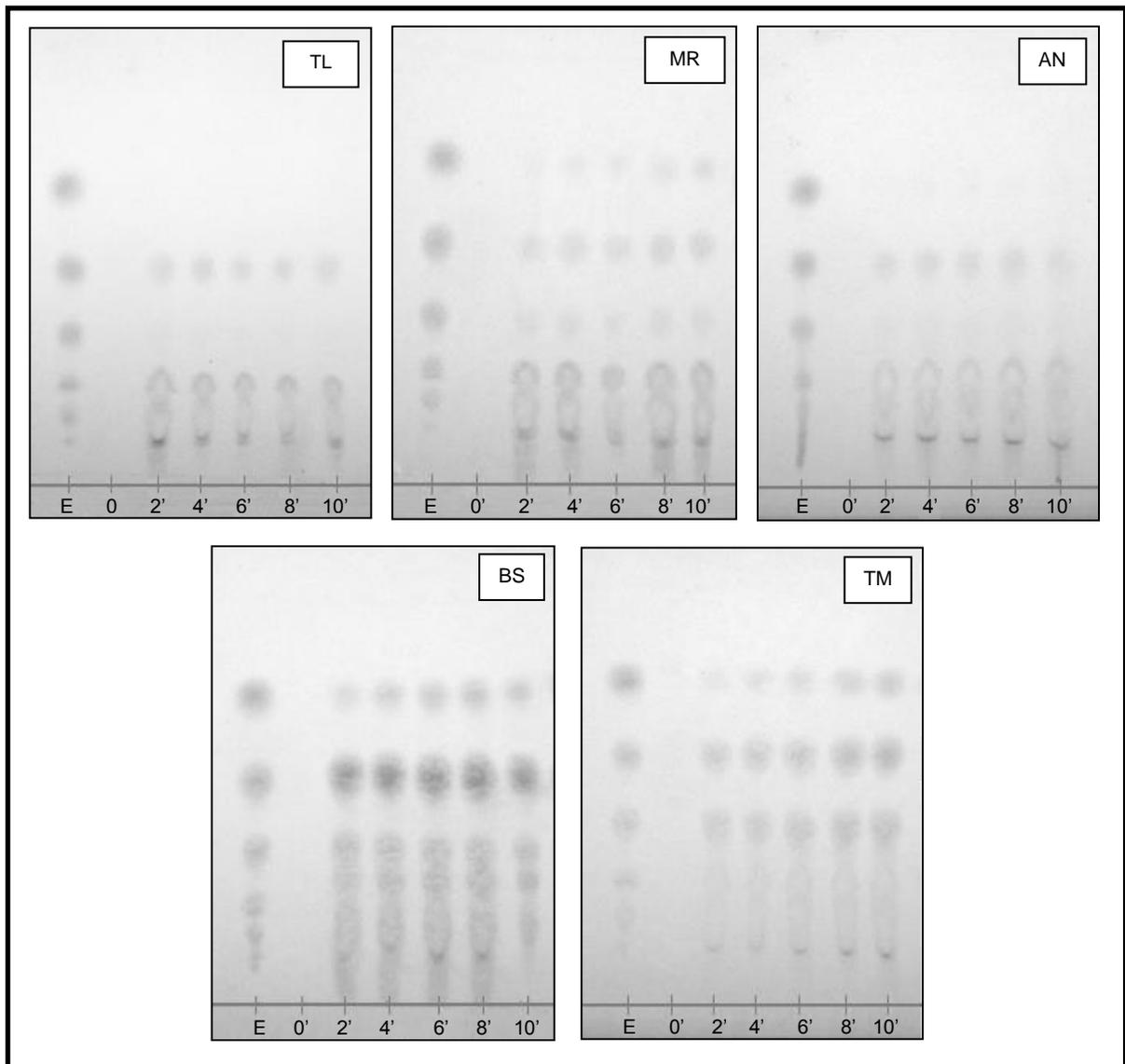


Figura 9. Hidrolisis enzimática del arabinoxilano puro con diferentes xilanasas. En el primer carril de cada placa se aplicó un estándar mezclado de xilooligosacáridos. En la esquina superior derecha de cada imagen se puede leer la abreviación para la identificación de la enzima que fue utilizada en la prueba.

A partir de las placas obtenidas se eligieron dos enzimas para utilizar en una prueba con harina como sustrato, las enzimas correspondientes a *T. longibrachiatum* (TL) y *T. maritima* (TM). La primera, fue elegida principalmente por la reproducibilidad que mostró durante el ensayo de TLC, mientras que TM se

eligió por ser la enzima que mostró un espectro de xilooligosacáridos más amplio.

4.6 Hidrolisis de la harina por xilanasas estándares a diferentes dosis y tiempo.

La figura 10 presenta las placas obtenidas para la primera enzima (TL) para concentraciones de enzima de 45 y 90 U/ml. Por los datos obtenidos de las placas de TL contra arabinoxilano puro (Figura 8) es posible deducir que la proporción de xilotriosa no cambia, ya que la enzima no es específica para ello, esto también permite conocer que la harina posee xilotriosa y xilobiosa soluble, la primera se observa en una mayor cantidad respecto a la segunda que pasa prácticamente desapercibida. Respecto a la hidrolisis de la harina, se observa la liberación de xilobiosa y xiloheptaosa, esta última solamente en TL 45.

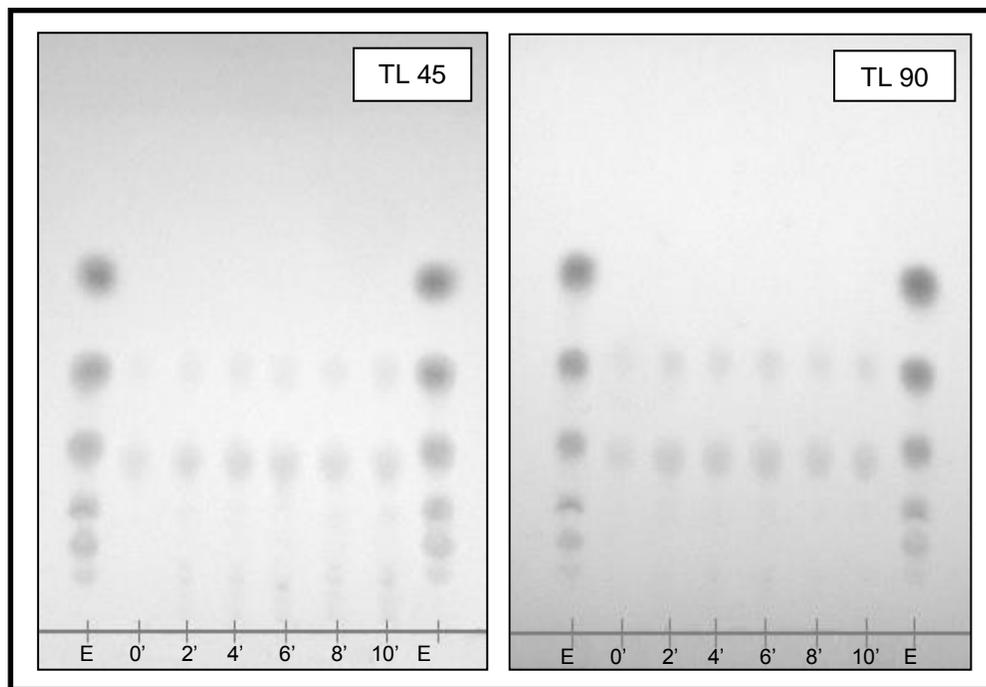


Figura 10. Digestión de la harina con xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum*. Se muestra a la izquierda la placa correspondiente a la aplicación de 45 U/ml de enzima (TL 45), a la derecha la placa correspondiente a la aplicación de 90 U/ml (TL 90). Se aplicó un estándar mezclado de concentración conocida al inicio y final de cada placa (E).

En cuanto a la digestión de la enzima por la segunda enzima TM (Figura 11) se observa nuevamente en el blanco que la harina contiene xilanos de tres carbonos y que se liberan xilobiosa, xilosa y xilohexaosa durante la hidrólisis, esta última a partir del minuto 4 para TM 45 y el minuto 2 para TM 90. Además existe un aumento en el tamaño e intensidad de la mancha correspondiente a xilotriosa lo cual es congruente con la acción de la enzima sobre arabinoxilano puro.

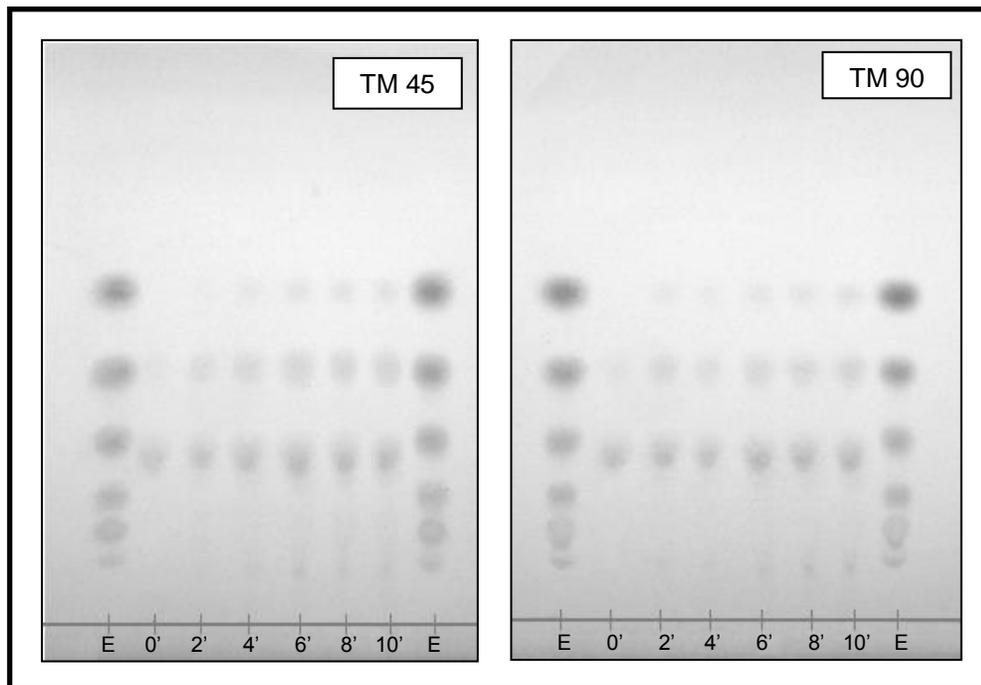


Figura 11. Digestión de la harina con xilanasa de *Thermotoga maritima*. Se observa a la izquierda la placa correspondiente a la aplicación de 45 U/ml de enzima (TM 45), a la derecha la placa correspondiente a la aplicación de 90 U/ml (TM 90). Se aplicó un estándar mezclado de concentración conocida al inicio y final de cada placa (E).

En la figura 12 se observa que la cantidad de azúcares iniciales en la harina varía fuertemente, esto puede atribuirse a que las condiciones de reacción fueron diferentes para cada una de las enzimas, para TL se usó un pH de 6.0 y para TM un pH de 5.0, esta variación puede deberse a que un ambiente más ácido produce la degradación del xilano.

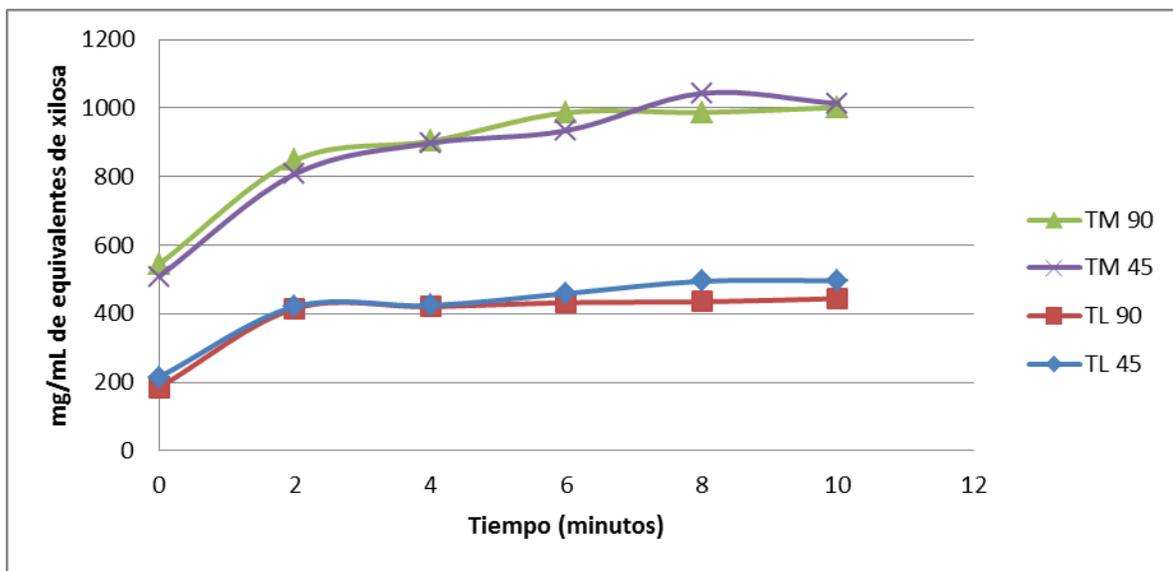


Figura 12. Hidrolisis de la harina con diferentes xilanasas a diferentes dosis y tiempos. Se muestran los resultados de los azúcares totales liberados por la acción de las enzimas de *T. longibrachiatum* (TL) y *T. maritima* (TM) a diferentes dosis (45 y 90 U/ml) y tiempos (0 a 10 minutos).

En el cuadro 7 y 8 se muestra para una mejor comprensión la cantidad de azúcares liberados en la prueba tomando como base el contenido inicial de xilosa presente naturalmente en la harina en el tiempo 0 de acción de la enzima.

Cuadro 7. Azúcares totales liberados por la enzima de *Trichoderma longibrachiatum* a concentraciones de 45 U/ml (TL 45) y 90 U/ml (TL 90) sobre harina de trigo. Los cálculos fueron hechos basados en la cantidad de azúcares equivalentes a xilosa liberados menos los azúcares totales presentes en la muestra de tiempo cero. Se muestra también el porcentaje de liberación de azúcares (%).

Tiempo (minutos)	TL 45		TL 90	
	Azúcares liberados (mg/ml)	%	Azúcares liberados (mg/ml)	%
0'	0.000 ± 0.000	0.000	0.000 ± 0.000	0
2'	205.491 ± 66.138	72.970	230.065 ± 66.739	88.8131
4'	208.738 ± 64.571	74.123	235.251 ± 43.234	90.8149
6'	243.846 ± 41.937	86.590	247.205 ± 39.534	95.4295
8'	279.665 ± 59.909	99.309	249.820 ± 36.902	96.4392
10'	281.610 ± 37.780	100.000	259.044 ± 121.878	100

Cuadro 8. Azúcares totales liberados por la enzima de *Thermotoga maritima* a concentraciones de 45 U/ml (TM 45) y 90 U/ml (TM 90) sobre harina de trigo. Los cálculos fueron hechos basados en la cantidad de azúcares equivalentes a xilosa liberados menos los azúcares totales presentes en la muestra de tiempo cero. Se muestra también el porcentaje de liberación de azúcares (%).

Tiempo (minutos)	TM 45		TM 90	
	Azúcares liberados (mg/ml)	%	Azúcares liberados (mg/ml)	%
0'	0.000 ± 0.000	0.000	0.000 ± 0.000	0.000
2'	298.872 ± 54.040	59.224	303.316 ± 93.879	66.321
4'	389.097 ± 85.916	77.102	358.809 ± 114.401	78.455
6'	425.534 ± 72.363	84.323	442.310 ± 122.275	96.712
8'	534.498 ± 56.772	105.915	442.871 ± 79.650	96.835
10'	504.650 ± 66.032	100.000	457.347 ± 68.787	100.000

A partir de las cuadro 7 y 8 se observa que la enzima correspondiente a TM libera una mayor cantidad de azúcares y que desde el minuto 2 de la prueba, la xilanasas de TM ha superado la liberación total de azúcares liberados por TL en los 10 minutos de la hidrólisis, a pesar de estar 30°C por debajo de su temperatura óptima.

En cuanto a los efectos de la concentración de enzima utilizada se observa que el porcentaje de liberación de azúcares se alcanza a una mayor velocidad cuando la enzima está más concentrada, siendo la acción de la enzima más rápida en los primeros cuatro minutos y volviéndose más lenta la liberación en los últimos minutos para las concentraciones de 90 U/ml. Sin embargo, a pesar de que la liberación de enzima es más lenta para las concentraciones de 45 U/ml la concentración final de azúcares resulta ligeramente mayor que cuando se usa más enzima.

4.7 Hidrolisis de arabinoxilano puro por enzimas comerciales

Una vez realizadas las pruebas para la hidrolisis de la harina con diferentes xilanasas a diferentes dosis y tiempos se procedió a realizar la prueba de las enzimas comerciales contra arabinoxilano puro por diez minutos para conocer el perfil de xilooligosacáridos que liberan (Figura 13).

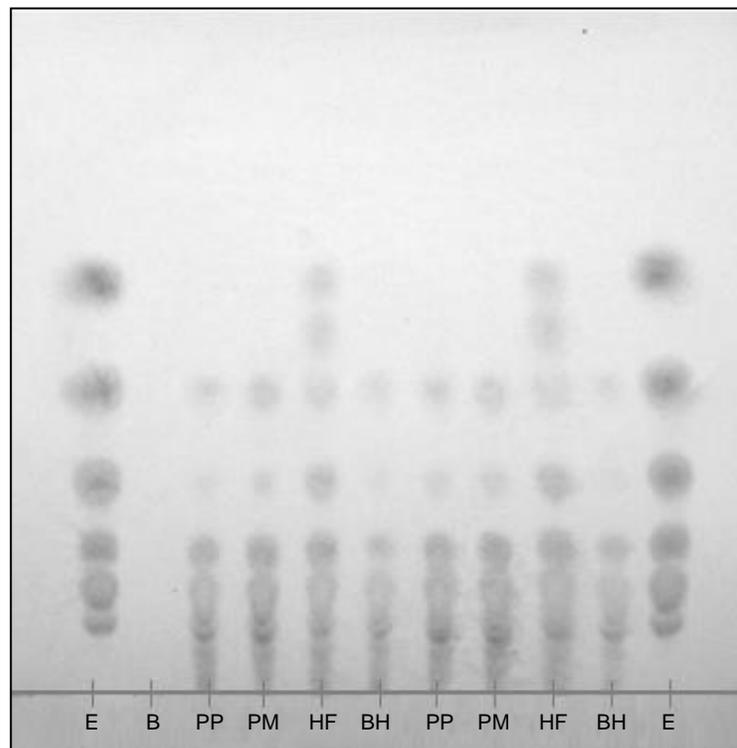


Figura 13. Hidrolisis del arabinoxilano puro por diferentes xilanasas comerciales. Las xilanasas utilizadas se identifican como: Pentopan Mono (PM), Pentopan Plus (PP), HPI FAX (HF) y Bakezyme HSP (BH). Se aplicó un estándar mezclado de concentración conocida al inicio y final de cada placa.

Para las enzimas comerciales Pentopan plus (PP), Pentopan mono (PM) y Bakezyme HSP (BH) se observa la liberación de los mismos xilooligosacáridos: xilobiosa, xilotriosa, xilotetraosa, xilopentaosa y xiloheptaosa, mientras que la enzima comercial HF muestra un comportamiento diferente liberando un espectro completo de xilooligosacáridos de uno a seis carbonos y mostrando la liberación de

un azúcar que suponemos correspondiente a la arabinosa.

4.8 Hidrolisis de harina de trigo por enzimas comerciales

Una vez determinado el perfil de xilooligosacáridos liberado por cada enzima comercial, se procedió a realizar la hidrolisis enzimática de la harina por las xilanasas comerciales. La placa de la prueba (Figura 14) muestra el mismo perfil para PP, PM y BH: liberación de xilobiosa y xilotriosa; además de la xilobiosa y xilotriosa, la HF libera xilosa y arabinoxilano.

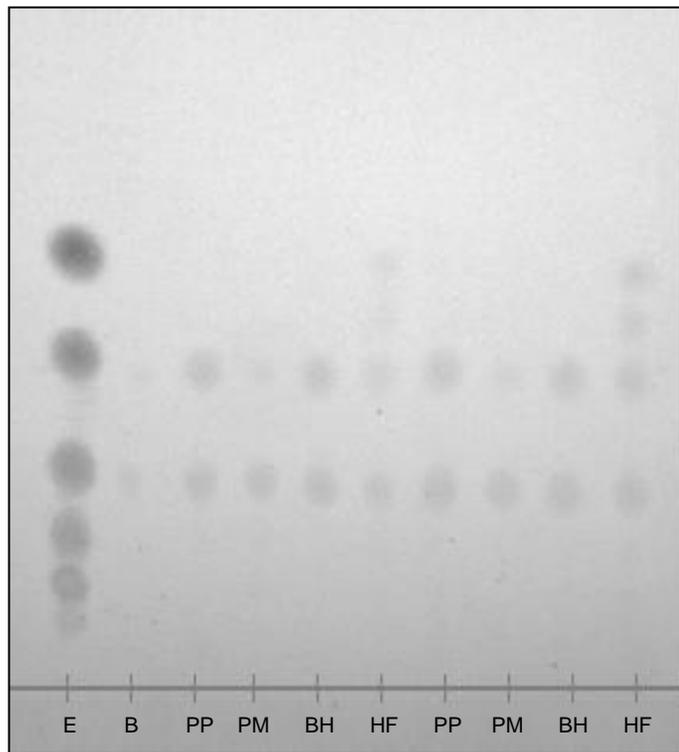


Figura 14. Hidrolisis de la harina por diferentes xilanasas comerciales. Las xilanasas utilizadas se identifican como: Pentopan Mono (PM), Pentopan Plus (PP), HPI FAX (HF) y Bakezyme HSP (BH). Se aplicó un estándar mezclado de concentración conocida (E).

A simple vista la enzima comercial PP muestra una mayor actividad que PM seguida por BH y HF, lo cual es congruente con el análisis de azúcares reductores (Figura 15). En esta imagen se observa que no existe ninguna diferencia en la cantidad de azúcares liberados por HF y BH.

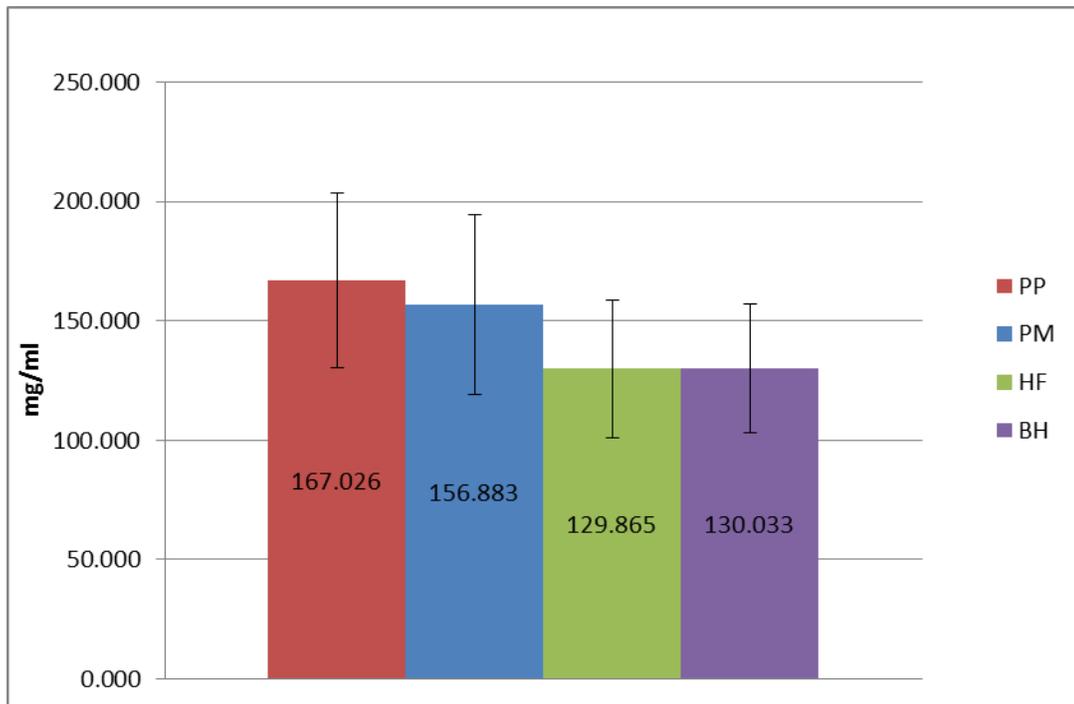


Figura 15. Azúcares totales liberados por las enzimas comerciales. Se muestra en el centro de la gráfica el valor correspondiente a mg/ml de equivalentes de xilosa (azúcares totales) liberados por cada enzima, además se agrega el valor de la desviación estándar a cada muestra.

5. DISCUSIÓN

5.1 TLC como herramienta para el análisis cualitativo de xilooligosacáridos

En los resultados se observó que de acuerdo con lo esperado los diferentes estándares de hexosas del mismo peso molecular poseen diferentes frentes relativos que permiten su identificación, comenzando con un mayor Rf para manosa, seguida por glucosa y galactosa; mientras para las dos pentosas presentes (arabinosa y xilosa) la xilosa tiene un Rf mayor. Este orden es congruente por lo reportado por Chandraju y col. en el 2001, aunque los valores de Rf son diferentes debido a que el método de corrimiento y detección es diferente, la posición relativa de los azúcares es igual a la reportada en la literatura (Fried y Sherma, 1999).

En cuanto a los diferentes xilooligosacáridos la posición en la placa es proporcional a la cantidad de moléculas de xilano que lo conforma comenzando por la xilohexaosa que posee el mayor peso molecular. Sin embargo, debido a que la distancia recorrida por los estándares variaba de una placa a otra, la determinación de los frentes relativos resultó una herramienta poco efectiva para la identificación de los xilooligosacáridos. Este problema se corrigió al añadir una mezcla de estándares de cada uno de los xilooligosacáridos en todas las placas, lo que nos permitió identificar cada xilooligosacárido

5.2 Perfiles de degradación de arabinoxilano por el uso de diferentes enzimas

En los perfiles de los xilooligosacáridos obtenidos para cada una de las xilanasas se observó que todas las enzimas liberaron xilosas de dos y seis carbonos además de otros tipos de xilosas para cada enzima. *Trichoderma longibrachiatum* libera también xilotetraosa; microorganismos del rumen xilosa y xilotetraosa;

Aspergillus niger xilotetraosa y xilopentaosa; *Bacillus stearothermophilus* xilosa y xilotriosa y *Thermotoga maritima* xilosa, xilotriosa y xilotetraosa.

A simple vista la enzima más eficiente para la degradación del xilano es la correspondiente a *B. stearothermophilus*. Esta enzima tiene perfiles con manchas mucho más grandes que las demás y presenta el perfil de un azúcar desconocido cuya mancha se observa entre las xilosas de 3 y 4 carbonos, pudiendo corresponder al perfil de una arabinosil-xilobiosa reportado como estándar en esa posición por Adelsberger y col. El inconveniente de esta enzima radica en el costo por unidad enzimática que presenta, ya que mientras para las demás enzimas el precio varía de 142 a 158 € por 8000 unidades, esta enzima es vendida a 150 € por solo 2000 unidades, esta diferencia en precio podría hacer más difícil su uso, especialmente al ser comparada con la enzima correspondiente a *T. maritima* que posee un perfil de xilooligosacáridos adecuado y es más barata.

En cuanto a las tres enzimas restantes (*T. longibrachiatum*, microorganismos del rumen y *B. stearothermophilus*) *T. longibrachiatum* resultó más adecuada para la aplicación de las pruebas siguientes ya que mostró mayor repetitividad en la prueba, posee el estatus GRAS (Abril 1ro 2011) aunque podría resultar tener efectos en la harina no conocidos, a diferencia de la xilanasa de *A. niger* que GRANOTEC usa en sus enzimas comerciales. En cuanto a las xilanasas de microorganismos del rumen, no fue utilizada por su perfil de hidrolisis que solo variaba por la liberación de xilotriosa de *T. longibrachiatum*, además de que la reproducibilidad mostrada al realizar las hidrolisis en la placa era mucho menor que las otra cuatro enzimas mencionadas.

5.3 Cinética de la hidrolisis de arabinoxilano

En las imágenes correspondientes a la cinética de la hidrolisis se observa que en ninguna de las placas se mostró disminución o desaparición de alguna de las

manchas correspondientes a xilooligosacáridos liberados lo que sugiere que las enzimas solo hidrolizaron el arabinoxilano pero no sus productos. En estudios realizados con xilanasas, principalmente para la industria del papel, es posible observar esta clase de cambios donde las manchas correspondientes a xilooligosacáridos liberados por la misma enzima se ven reducidas para aumentar la cantidad de xilooligosacáridos más sencillos. En este trabajo se utilizó una gran cantidad de enzima para poder analizar los perfiles de hidrolisis de hidrólisis y aun así ninguna enzima consumió por completo la arabinosa utilizada, lo que es también evidente durante la separación de los polisacáridos con etanol donde se formó un precipitado de gran tamaño.

5.4 Hidrolisis de la harina por xilanasas estándares a diferentes dosis y tiempo

De las enzimas utilizadas durante esta prueba fue la perteneciente a *T. maritima* la que mostró un mejor perfil de liberación de xilooligosacáridos tanto cualitativa como cuantitativamente a pesar de no haber estado en la temperatura óptima para la actividad de la enzima. La enzima correspondiente a *T. maritima* es una enzima termoestable (Zhang y col., 2008), pero esto no representa una ventaja en el proceso ya que la fermentación del pan se realiza a temperatura ambiente y podría mostrar diferentes perfiles de liberación de xilooligosacáridos durante todo el proceso de fabricación del pan, no solo durante el amasado, sobre todo durante la fase de fermentación y las primeras fases del horneado cuando la temperatura de la masa aumenta lo suficiente para acercarse a la temperatura óptima de la enzima pero no demasiado como para desactivarla.

En cuanto a la actividad de la enzima es importante hacer notar que aunque el tiempo de mezclado suele ser de 10 minutos y no más, para evitar la modificación de las propiedades reológicas de la masa (Calaveras, 2004), existen procesos donde el tiempo necesario para la obtención de la red de gluten es menor ya que este varía de receta a receta, y debido a que la liberación de la mayor parte de los

de los xilooligosacáridos ocurre de los primeros 6 a 8 minutos de la hidrólisis, el uso de cualquiera de las enzimas analizadas en este trabajo permitiría dejar de amasar una vez formada la red de gluten dado que a partir de 6 minutos ya se liberó una cantidad adecuada de xilooligosacáridos.

5.5 Actividad de las enzimas comerciales

Al analizar la actividad de las enzimas comerciales respecto a la cantidad de azúcares totales liberados podemos calificar a la enzima Pentopan Plus como la más eficiente. Si calculamos la actividad de las enzimas en base a los azúcares liberados por la Pentopan Plus (PP) como un 100%, Pentopan mono (PM) libera 93.93%, HPI FAX (HF) 77.75% y Bakezyme HSP (BH) 77.85% de los azúcares liberados por la Pentopan Plus. La importancia de conocer este análisis radica en que el caso del costo de las enzimas, ya que es necesario comparar si la relación costo-beneficio de la enzima junto con la cantidad de dosis recomendada resulta económicamente adecuada, sobre todo para PM, PP y BH que presentan el mismo perfil de xilooligosacáridos liberados, por lo que se esperaría que su aplicación sobre la masa en durante la panificación tuviera un efecto similar. En cuanto a HF su uso en la panificación sería interesante por la liberación de xilosa y arabinosa durante el proceso, ya que además de los xilooligosacáridos que modifican las propiedades de la masa y agregan valor como prebiótico por ser azúcares no digeribles, la arabinosa ha demostrado tener efectos positivos reduciendo los factores de riesgo de síndromes metabólicos (Krog-Mikkelsen y col., 2011).

Por otra parte, en la comparación entre las enzimas comerciales y las enzimas puras utilizadas, es importante mencionar que la cantidad empleada de enzima comercial se calculó para añadir aproximada 45 U/ml de acuerdo a datos obtenidos en un trabajo anterior con la misma empresa (datos no mostrados). En general las enzimas puras funcionaron mejor al liberar cantidades más altas de xilooligosacáridos que las enzimas comerciales esto puede deberse tanto al medio

en que se encuentra la enzima, como a su presentación, mientras que las enzimas puras se obtuvieron en suspensión y se mantuvieron a 4°C, las enzimas comerciales se obtuvieron liofilizadas y se mantuvieron a temperatura ambiente.

Como consideración final a este trabajo cabe señalar que para una mejor comprensión de la actividad de estas enzimas se requiere de la realización de pruebas reológicas que relacionen individualmente los perfiles de xilooligosacáridos con las propiedades finales de la masa y el pan, así como el contenido final de xilooligosacáridos y arabinosa, según sea el caso (Hilhorst y col., 1999; Popper y col., 2007).

6. CONCLUSIONES

La metodología de hidrolisis y análisis de xilanos por TLC presentada resultó una herramienta útil para la determinación de perfiles de xilooligosacáridos en muestras de hidrolisis de xilanasas usando como sustrato arabinoxilano puro o harina de trigo comercial. Sin embargo, para una mejor comprensión de la acción de los perfiles obtenidos es necesaria una comparación de las características reológicas con la aplicación de estas enzimas.

La enzima comercial que mayor actividad mostró correspondiente a Pentopan Plus resulta comparable, no solo por su actividad sino por el perfil de liberación de xilooligosacáridos y arabinosa, respecto a la enzima HPI FAX que pudiera tener un mayor valor agregado al consumo del pan. Así mismo, se sugiere la búsqueda de enzimas comerciales provenientes de *T. maritima* que muestran un perfil de liberación mucho mayor a las enzimas utilizadas actualmente en la panificación, pudiendo remplazarlas en menores dosis con los mismos o mayores beneficios

7. BIBLIOGRAFÍA

Arenas L, Marín M, Castro M, Sandoval L. Determinación por HPLC de los azúcares en los frutos de guayaba (*Psidium gpajava L.*) de una plantación comercial del Municipio Mara. Rev Fac Agron. **1995**; 12: 467-483.

Atwell WA, Hood LF, Lineback DR, Varriano-Marston E, Zobel HF. The terminology and methodology associated with basic starch phenomena. Cereal Foods World. **1988**; 33: 306-311.

Bastawde KB. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. World J Microbiol Biotechnol. **1992**; 8(4): 353– 368.

Butt MS, Tahir-Nadeem M, Ahmad Z, Sultan MT. Xylanases and their applications in baking industry. Food Technol Biotechnol. **2008**; 46(1): 22-31.

Calaveras J. Nuevo tratado de panificación y bollería. Madrid: Mundi-prensa libros, **2004**: 88-90.

Carter CA. Current and future trends in the global wheat market. En: Ekboir J, Ed. CIMMYT 2000-2001 World wheat overview and outlook: Developing no-till packages for small-scale farmers. Ciudad de México: International maize and wheat improvement centre (CIMMYT), **2002**: 45-51.

Chandraju S, Mythily R, Chidan-Kumar CS. Separation & identification of simple sugar metabolites from non-edible Pomegranate (*Punica granatum L.*) via TLC and on-line Electrospray Mass Spectrometry. J Chem Pharm Res. **2011**; 3(4):422-429.

Courtin CM, Delcour JA. Arabinoxylans and endoxylanase in wheat flour bread making. J Cereal Sci. **2002**; 35: 225-243.

Dornez E, Gebruers K, Cuyvers S, Dekcour JA, Courtin CM. Impact of wheat flour-associated endoxylanases on arabinoxylan in dough after mixing and resting. J Agric Food Chem. **2007**; 55: 7149-7155.

Dornez E. Insight into the distribution and variability of endoxylanases in wheat and their functionality during bread making. Tesis de doctorado. **2007**. Facultad de Ingeniería en Biociencias. Universidad Católica de Lovaina.

- Dubois** M, Gilles K, Hamilton J, Rebers P, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* **1956**; 28: 350-356.
- Farag** KFM. The inheritance and molecular mapping of genes for post-anthesis drought tolerance (PADT) in wheat. Tesis de doctorado. **2004**. Facultad de Agricultura, Universidad de Halle-Wittenberg.
- French** D. Organization of starch granules. En Whistler RL, Bemiller JN, Paschal EF, Eds. *Starch chemistry and technology*. Nueva York: Academic Press: **1984**: 183-212.
- Fried** B, Sherma J. *Thin-layer chromatography*. Nueva York: Marcel Dekker Inc. **1999**.
- Gray** JA, Bemiller JN. Bread staling: molecular basis and control. *Compr Rev Food Sci Food Safety.* **2003**; 2: 1-21.
- Haros** M, Rosell CM, Benedito C. Effect of different carbohydrases on fresh bread texture and bread staling. *Eur Food Res Technol.* **2002**; 215: 425–430.
- Hernández** A, Alfaro I, Arrieta R. *Microbiología industrial*. Costa Rica: Editorial UNED, **2003**: 177-192.
- Hilhorst** R, Dunnewind B, Orsel R, Stegeman P, van Vliet T, Gruppen H, Schols HA. Baking performance, rheology, and chemical composition of wheat dough and gluten affected by xylanase and oxidative enzymes. *J Food Sci.* **1999**; 64: 808–813.
- Hosney** CR. *Principles of cereal science and technology*. 2da edición. Minnesota: American Association Cereal Chemists, **1994**.
- Hug-Iten** S, Handsin S, Conde-Petit B, Escher F. Changes in starch microstructure on baking and staling of bread. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Tegnologie.* **1999**; 32: 255-260.
- INEGI**. Boletín de información oportuna del sector alimentario [monografía en Internet]. México: Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, **2012** [consultado 2013, enero, 14]; Número 23; 5-10, 55-56. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sectorial/biosa/biosa.pdf.
- Kent** NL, Evers AD. *Cereals of the world: Origin, classification, types and quality*.

En: Kent's Technology of Cereals. Nueva York: Elsevier Science Ltd. 1994: 53-77.

Keskin SO. Effects of different ovens and enzymes on quality. Tesis de maestría. **2003**. Departamento de ingeniería en alimentos. Universidad Técnica de Medio Oriente.

Krog-Mikkelsen I, Hels O, Tetens I, Holst J, Andersen JR, Bukhave K. The effects of L-arabinose on intestinal sucrase activity: dose-response studies in vitro and in humans. *Am J Clin Nutr.* **2011**; 94(2):472-8.

Lascano AV. Estudio reológico de mezclas de harinas de cereales: cebada (*Hordeum vulgare*), maíz (*Zea mays*), quinua (*Chenopodium quinoa*), trigo (*Triticum vulgare*) y tubérculo: papa (*Solanum tuberosum*) nacionales con trigo (*Triticum vulgare*) importado para orientar su uso en la elaboración de pan y pastas alimenticias. Tesis de licenciatura. **2010**. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Técnica de Ambato.

López F, Alfaro A, Caparrós S, García M, Pérez A, Garrote G. Aprovechamiento energético e integrado por fraccionamiento de biomasa lignocelulósica forestal y agroindustrial. Caracterización de hemicelulosas, celulosas y otros productos del fraccionamiento. Boletín informativo del CIDEU [serie en Internet] **2008** [consultado 2013, febrero, 8]; 5: 7-19. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2718824>.

Maat J, Roza J, Verbakel J, Starn H, Bosse M, Rotterdam C. Xylanases and their application in bakery. En Visser J, Beldman G, Vansomeren MAK, Voragen AGJ, Eds. Xylans and Xylanases. Amsterdam: Elsevier, **1992**: 325-337.

Martinez MA, Jimenez T. Functionality of enzymes that hydrolyze starch and non-starch polysaccharide in breadmaking. *Z Lebensm Unters Forsch A.* **1997**; 205: 209-214.

Mathewson PR. Enzymatic activity during bread baking. *Cereal Foods World.* **2000**; 45: 98-101.

Mesas JM, y Alegre M. T. El pan y su proceso de elaboración. Ciencia y tecnología alimentaria [serie en Internet] **2002** [consultado 2013, enero, 16]; 3: 307-309. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/724/72430508.pdf>.

Oleson BT. World wheat production, utilization and trade En Edici-Bushuk W, Rasper VF, Eds. . Wheat Production Properties and Quality. Glasgow: Blackie Academic & Professional, **1994**: 1-25.

Pastor JFI, Gallardo O, Sanz-Aparicio J, Díaz P. Xilanases: molecular properties and applications. En: Polaina J, MacCabe AP, Eds. Industrial Enzymes. Dordrecht: Springer, **2007**: 65–82.

Popper L. Enzymes - Best Friends of Flours [monografía en Internet]. Alemania: Mühlenchemie GmbH & Co. KG, **2005** [consultado 2013, enero, 30]. Disponible en: <http://www.muehlenchemie.de/downloads-expertenwissen/mc-enzyme-popper-eng.pdf>.

Popper L, Schäfer W, Freund W. Future of flour: Dough rheology as a function of flour treatment [monografía en Internet]. Alemania: Mühlenchemie GmbH & Co KG, **2007** [consultado 2013, octubre 13]. Disponible en: http://www.muehlenchemie.de/downloads-future-of-flour/FoF_Kap_18-10.pdf

Roets C. Effect of endoxylanases, endoglucanases and their combination on wheat flour bread quality. Tesis de maestría. **2009**. Facultad de Agrociencias. Universidad de Stellenbosch.

SAGARPA. Trigo situación nacional [monografía en Internet]. Baja California: Gobierno del estado de Baja California, **2008** [consultado 2013, enero, 14]. Disponible en: <http://www.oeidrus-bc.gob.mx/sispro/trigobc/Produccion/Mundial/Nacional2.pdf>.

Shewry PR, Halford NG. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in utilization. J Exp Bot. **2002**; 53: 947-958.

Singh H, MacRitchie F. Application of polymer science to properties of gluten. J Cereal Sci. **2001**; 33: 231-243.

Stauffer CE. Dietary fibre: analysis, physiology and calorie reduction. En Kamel BS, Stauffer CE. Advances in Baking Technology. Glasgow: Blackie Academic & Professional, **1993**: 371-369.

Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. Critical Rev in Biotech. **2002**; 22:33-64.

Therdthai N, Zhou W, Adamczak T. Optimization of the temperature profile in bread baking. *J Food Eng* .**2002**; 55: 41-48.

Vega-Ruiz G. Proteínas de la harina de trigo: clasificación y propiedades funcionales. *Temas de ciencia y tecnología [serie en Internet]* **2009** [consultado 2013, enero, 12]; volumen 3: 27-32. Disponible en: http://www.utm.mx/edi_anteriores/Temas38/2NOTAS%2038-1.pdf.

Veraverbeke WS, Delcour JA. Wheat protein composition and properties of wheat glutenin in relation to bread making functionality. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr*. **2002**; 42(3): 179-208.

Wang M, van Vliet T, Hamer RJ. Evidence that pentosans and xylanase affect the re-agglomeration of the gluten network. *J Cereal Sci*. **2004**; 39: 41–349.

Wang M. Effect of pentosans on gluten formation and properties. Tesis de doctorado. **2003**. Departamento de agrotecnología y Ciencias de la alimentación. Universidad de Wageningen.

Zhang J, Pan J, Guan G, Li Y, Xue W, Tang G, Wang A, Wang H. Expression and high-yield production of extremely thermostable bacterial xylanaseB in *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol*. **2008**; 43: 513–516

Zverlov VV, Schantz N, Schmitt-Kopplin P, Schwarz WH. Two new major subunits in the cellulosome of *Clostridium thermocellum*: xyloglucanase Xgh74A and endoxylanase Xyn10D. *Microbiology*. **2005**; 151: 3395-3401.

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de información de la enzima de *Bacillus stearothermophilus* T6



β -D-XYLANASE from *Bacillus stearothermophilus* T6 (Lot 101003a)

Recombinant - Thermostable
E-XYNBS 11/2011
(EC 3.2.1.8) endo-1,4- β -D-xylanase
CAZy: GH Family 10

PROPERTIES:

- ELECTROPHORETIC PURITY:**
 - Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 43,600)
 - Single major band on isoelectric focusing (pI ~ 6.5)
- SPECIFIC ACTIVITY:**
65 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 6.5 and 70°C; 12 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 6.5 and 40°C

One Unit of xylanase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of xylose reducing-sugar equivalents per minute from wheat arabinoxylan (5 mg/mL) in MES buffer (100 mM) pH 6.5.
- RELATIVE RATES OF HYDROLYSIS OF SUBSTRATES:**

Substrate	%
Wheat Arabinoxylan	100
CM-Cellulose 4M	~ 0.04
Barley β -Glucan	~ 5.7

Action on polysaccharide substrates was determined at a final substrate concentration of 5 mg/mL in MES buffer (100 mM), pH 6.5 at 40°C.
- PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:**
pH Optima: 6.5
pH Stability: 3.0 - 9.0 (> 75 % control activity after 24 hours at 4°C)
Temperature Optima: 70°C (10 min. reaction)
Temperature Stability: up to 60°C (> 90 % control activity after 15 min.)
- STORAGE CONDITIONS:**
The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02 % (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. For assay, this enzyme should be diluted in MES buffer (100 mM), pH 6.5 containing 0.5 mg/mL BSA. Swirl to mix the enzyme immediately prior to use.

Anexo 2.Hoja de información de la enzima de *Thermotoga maritima*



β -D-XYLANASE from *T. maritima* (Lot 91101a)

Recombinant - Thermostable

E-XYLATM

03/10

Catalytic domain of Xyn10A from *Thermotoga maritima*

(EC 3.2.1.8) *endo*-1,4- β -D-xylanase

CAZY: GH Family 10

PROPERTIES

1. ELECTROPHORETIC PURITY

- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW ~ 41,700)
- Single major band on isoelectric focusing (pI ~ 5.9)

2. SPECIFIC ACTIVITY

115 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 5.0 and 80°C; 22 U/mg protein (on wheat arabinoxylan) at pH 5.0 and 40°C

One Unit of xylanase activity is defined as the amount of enzyme required to release one μ mole of xylose reducing-sugar equivalents per minute from wheat arabinoxylan (5 mg/mL) in sodium acetate buffer (100 mM) pH 5.0.

3. RELATIVE RATES OF HYDROLYSIS OF SUBSTRATES

Substrate	%
Wheat Arabinoxylan	100
CM-Cellulose 4M	~ 0.1
Barley β -Glucan	~ 0.4

Action on polysaccharide substrates was determined at a final substrate concentration of 5 mg/mL in sodium acetate buffer (100 mM), pH 5.0 at 40°C.

4. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

pH Optima: 5.0
pH Stability: 3.0 - 9.0 (> 75 % control activity after 24 hours at 4°C)
Temperature Optima: 80°C (10 min. reaction)
Temperature Stability: up to 90°C (> 90 % control activity after 15 min.)

5. STORAGE CONDITIONS

The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02 % (w/v) sodium azide and should be stored at 4°C. For assay, this enzyme should be diluted in sodium acetate buffer (100 mM), pH 5.0 containing 0.5 mg/mL BSA. **Swirl to mix the enzyme immediately prior to use.**

Anexo 3. Hoja de información de la enzima de microorganismos del rumen



endo-1,4- β -XYLANASE M6 (from rumen microorganism) (Lot 80202b)

E-XYRU6

09/2011

(EC 3.2.1.8) 4-beta-D-xylan xylanohydrolase

PROPERTIES

1. ELECTROPHORETIC PURITY:

- Single band on SDS-PAGE (MW = 26,500)
- Several bands on isoelectric focusing:
(major bands pI's 6.0, 6.6 and 6.9)
(minor bands pI's 3.6-5.1 and 7.0)

2. SPECIFIC ACTIVITY AND LEVEL OF OTHER ACTIVITIES:

Substrate	Specific Activity (U/mg at 40°C; pH 6.0)
Wheat arabinoxylan	380
CM-Cellulose 4M	< 0.001
Barley β -Glucan	< 0.001
Carob Galactomannan	< 0.001
p-Nitrophenyl α -L-arabinofuranoside	< 0.001
p-Nitrophenyl β -xyloside	< 0.001
Casein (protease)	< 0.001

3. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES:

pH Optima:	5.5-6.5 (5 min assay period)
pH Stability:	6.0-8.5 (very unstable below pH 5.5)
Temperature Optima:	55°C
Temperature Stability:	<55°C

4. STORAGE CONDITIONS:

The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% sodium azide and should be stored at 4°C.

The concentration of enzyme as supplied is approximately 2100 U/mL.

Anexo 4. Hoja de información de la enzima de *Trichoderma longibrachiatum*



endo-1,4-β-XYLANASE M3 (from *T. longibrachiatum*) (Lot 01001)

E-XYTR3

01/08

PROPERTIES

1. ELECTROPHORETIC PURITY

- Single band on Isoelectric focusing (pI ~ 9.0).
- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW = 20,000)

2. SPECIFIC ACTIVITY AND LEVEL OF OTHER ACTIVITIES

SUBSTRATE	SPECIFIC ACTIVITY (U/mg Protein)
Wheat arabinoxylan	200
CM-Cellulose 4M	104
CM-Cellulose 7M	7.4
Barley β-Glucan	133
Carob Galactomannan	< 0.001
Starch	< 0.001
p-Nitrophenyl α-L-arabinofuranoside	< 0.13
p-Nitrophenyl β-xyloside	< 0.004

3. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES

pH Optima	6.0
pH Stability	3.0-8.0
Temperature Optima	50°C
Temperature Stability	<55°C

4. STORAGE CONDITIONS

The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% sodium azide and should be stored at 4°C.

Anexo 5.Hoja de información de la enzima de *Aspergillus niger*



endo-1,4-β-XYLANASE M4 (from <i>A. niger</i>) (Lot 51204)	
E-XYAN4	02/06
PROPERTIES	
1. ELECTROPHORETIC PURITY	
- Single band on Isoelectric focusing (pI ~ 3.7).	
- Single band on SDS-gel electrophoresis (MW = 25,000)	
2. SPECIFIC ACTIVITY AND LEVEL OF OTHER ACTIVITIES	
SUBSTRATE	SPECIFIC ACTIVITY (U/mg Protein)
Wheat arabinoxylan	79.3
CM-Cellulose 4M	39.8
CM-Cellulose 7M	1.9
Barley β -Glucan	45
Carob Galactomannan	< 0.02
Starch	< 0.04
p-Nitrophenyl α -L-arabinofuranoside	< 0.0006
p-Nitrophenyl β -xyloside	< 0.0002
3. PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES	
pH Optima	4.5
pH Stability	3.0-8.0
Temperature Optima	60°C
Temperature Stability	<70°C
4. STORAGE CONDITIONS	
The enzyme is supplied as an ammonium sulphate suspension in 0.02% sodium azide and should be stored at 4°C.	