

Artículo Científico

Geles covalentes de arabinosilanos ferulados inducidos con lacasa o peroxidasa: estructuras de entrecruzamiento, características reológicas y actividad antioxidante

Covalent gels of ferulated arabinosylans induced with laccase or peroxidase: cross-linking structures, rheological characteristics and antioxidant activity

Nedie S. Chávez-Gutiérrez¹, Karla G. Martínez-Robinson^{1*}, Rafael Canett-Romero³, María D. Figueroa-Pizano¹, Alma C. Campa-Mada¹, Yubia B. De Anda-Flores¹, Jorge A. Marquez-Escalante¹, Agustín Rascón-Chu², Elizabeth Carvajal-Millan^{1*}

¹ Biopolímeros, CTAOA. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, Hermosillo, Sonora, México. CP 83304. Tel. (662) 289 2400.

² Biotecnología, CTAOV. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, Hermosillo, Sonora, México. CP 83304. Tel. (662) 289 2400.

³ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad de Sonora. Blvd. Luis Encinas y Av. Rosales. Hermosillo, Sonora, México. CP. 83000

*Correspondencia: karlagm@ciad.mx (Karla G. Martínez-Robinson), ecarvajal@ciad.mx (Elizabeth Carvajal-Millan)

DOI: <https://doi.org/10.54167/tch.v17i1.1099>

Recibido: 11 de noviembre de 2022; Aceptado: 14 de abril de 2023

Publicado por la Universidad Autónoma de Chihuahua, a través de la Dirección de Investigación y Posgrado

Resumen

Los arabinosilanos ferulados (AX) forman geles covalentes por acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico (AF) generando dímeros (di-AF) y trímeros de AF como estructuras de entrecruzamiento. En esta investigación se estudió el efecto de la gelificación de AX inducida con lacasa o peroxidasa, sobre las estructuras de entrecruzamiento, las características reológicas y la actividad antioxidante de los geles desarrollados. Los geles de AX al 2% (p/v) formados con peroxidasa registraron valores mayores de di-AF (0.195 µg/g) y módulo elástico (94 Pa) respecto a los obtenidos con lacasa (0.153 µg/g y 79 Pa, respectivamente). Además, los geles inducidos con peroxidasa presentaron mayor actividad antioxidante (13.21 y 3.3 µmol de TEAC/g muestra por método ABTS+ y DPPH, respectivamente) en relación con los generados con lacasa (9.63 y 3.0 µmol de TEAC/g muestra por

método ABTS+ y DPPH, respectivamente), lo cual podría atribuirse al mayor contenido de di-AF 8-5' y 5-5'. Es posible que las diferencias entre estos geles estén relacionadas con el mecanismo de acción de las enzimas utilizadas. La lacasa oxida directamente al AF en AX mientras que, con peroxidasa, el H₂O₂ realiza esta acción y, por su bajo peso molecular, podría acceder más fácilmente al AF del polisacárido, favoreciendo su entrecruzamiento.

Palabras clave: Arabinoxilanos ferulados, lacasa, peroxidasa, geles, caracterización

Abstract

Ferulated arabinoxylans (AX) form covalent gels by oxidative coupling of ferulic acid (FA) generating dimers (di-FA) and FA trimers as crosslinking structures. In this investigation, the effect of AX gelation induced with laccase or peroxidase on the cross-linking structures, rheological characteristics and antioxidant activity of the developed gels was studied. The 2% (w/v) AX gels formed with peroxidase registered higher values of di-FA (0.195 µg/g) and elastic modulus (94 Pa) compared to those obtained with laccase (0.153 µg/g and 79 Pa, respectively). In addition, the gels induced with peroxidase presented higher antioxidant activity (13.21 and 3.3 µmol of TEAC/g sample by the ABTS+ and DPPH method, respectively) in relation to those generated with laccase (9.63 and 3.0 µmol of TEAC/g sample by the ABTS+ method and DPPH, respectively), which could be attributed to the higher content of di-FA 8-5' and 5-5'. It is possible that the differences between these gels are related to the mechanism of action of the enzymes used. Laccase directly oxidizes FA in AX while, with peroxidase, H₂O₂ performs this action and, due to its low molecular weight, could more easily access the FA of the polysaccharide, favoring its crosslinking.

Keywords: Ferulated arabinoxylans, laccase, peroxidase, gels, characterization

1. Introducción

Los arabinoxilanos ferulados (AX) son polisacáridos presentes en diversos cereales, tanto en pericarpio y aleurona como en endospermo. En los últimos años se ha acrecentado el interés por los AX y sus derivados ya que se han asociado con efectos benéficos a la salud como antioxidantes (Malunga y Beta, 2015), prebióticos (Marquez-Escalante *et al.*, 2018), inmunoestimulantes (Mendis *et al.*, 2016), reguladores de glucosa y colesterol (Vogel *et al.*, 2012) y agentes antiproliferativos (Melo-Silveira *et al.*, 2019).

Una característica importante de los AX es su capacidad para producir geles por entrecruzamiento de sus cadenas poliméricas mediante acoplamiento oxidativo del ácido ferúlico (AF) por vía enzimática. Las enzimas lacasa y peroxidasa inducen la formación de dímeros (di-AF) y trímeros (tri-AF) de AF. Estos entrecruzamientos covalentes en la red polimérica proporcionan a los geles de AX características particulares como ser poco afectados por cambios de temperatura, fuerza iónica o pH. Debido a lo anterior, a estos geles se les atribuye un gran potencial de aplicación como matrices para la liberación controlada de biomoléculas en la industria alimentaria, biomédica y biotecnológica (Knudsen y Lærke, 2010; Mendez-Encinas *et al.*, 2018).

Las características estructurales de los AX están relacionadas con su fuente y definen las propiedades de los geles formados; por ejemplo, los AX de maíz presentan un mayor contenido de AF que los AX

de trigo y por lo tanto forman geles con un contenido más alto de di-AF comparado con geles de AX de trigo (Niño-Medina *et al.*, 2010). En este sentido, una fuente importante para la obtención de los AX es el residuo obtenido de la producción de bioetanol de maíz llamado granos secos de destilería con solubles (Dried distillers grains with solubles, DDGS) (Fierro-Islas *et al.*, 2018). Este subproducto de maíz es de bajo costo y destinado principalmente a la alimentación de animales por lo que su uso como fuente de AX representa una alternativa interesante para otorgarle valor agregado y aumentar la sustentabilidad de la producción de bioetanol de maíz (Mendez-Encinas *et al.*, 2018).

Respecto a la gelificación de los AX, se ha reportado que el tipo de agente entrecruzante utilizado tiene un efecto en las propiedades de los geles formados (Martínez-López *et al.*, 2019). Sin embargo, no existe información suficiente que permita comparar el efecto de distintas enzimas en la gelificación de AX con diferentes características. En este sentido es necesario generar nuevo conocimiento sobre el efecto de la relación entre estructura de AX, enzima entrecruzante y características de los geles de AX formados. Por otro lado, se ha encontrado que, en general, la actividad antioxidante de los AX disminuye al formar un gel debido al acoplamiento oxidativo del AF que origina los di-AF y tri-AF, lo cual implica una reducción en el contenido de AF en el gel (Mendez-Encinas *et al.*, 2019a). No obstante, no se conoce aún el efecto de la formación de geles de AX con distinta enzima entrecruzante sobre la actividad antioxidante de estos materiales.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo del presente trabajo de investigación es estudiar el efecto del tipo de agente entrecruzante (lacasa o peroxidasa) sobre las estructuras de entrecruzamiento, las características reológicas y la actividad antioxidante de AX.

2. Materiales y métodos

2.1 Fuente de Obtención de los AX

Se utilizaron AX extraídos de un subproducto de la producción de bioetanol de maíz, los granos secos de destilería con solubles (DDGS), de acuerdo con el método reportado por Mendez-Encinas *et al.* (2019a). Los AX se extrajeron mediante hidrólisis alcalina con NaOH 0.5 N (25 °C, 2 h). Los sólidos se eliminaron por filtración (20-25 µm) y el filtrado se centrifugó a 12,096 g a 20 °C por 15 min (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). El sobrenadante se acidificó a pH 4 con HCl 3N. El líquido acidificado se centrifugó (12,096 g a 20 °C por 15 min), el sobrenadante se precipitó en etanol al 65% (v/v) a 4 °C y se secó por intercambio de solventes (Mendez-Encinas *et al.*, 2019a). La muestra seca se definió como arabinosilanos ferulados (AX). El rendimiento de los AX se calculó en porcentaje (% peso seco AX/peso seco DDGS) de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{g \text{ AX}}{g \text{ DDGS}} \right) \times 100\%$$

2.2 Caracterización de los AX

Identidad molecular

Se utilizó espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) (Nicolet iS50 FTIR, Nicolet Instrument Corp., Madison, WI, EUA) con reflectancia total atenuada (ATR), en modo de absorbancia de 400-4000 cm^{-1} y 4 cm^{-1} de resolución, siguiendo el procedimiento reportado por De Anda-Flores *et al.* (2020).

Contenido de azúcares neutros

El contenido de azúcares neutros se determinó mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), de acuerdo con la metodología establecida por Carvajal-Millan *et al.* (2007). La muestra de polisacárido se sometió a una hidrólisis con ácido trifluoroacético 4N a 120 °C durante 2 h, utilizando manitol como estándar interno. La reacción se detuvo con hielo y el extracto fue evaporado a 50 °C y enjuagado dos veces con 200 μL de agua Milli-Q. El extracto evaporado fue solubilizado en 1 mL de agua ultrapura y se filtró utilizando un tamaño de poro de 0.45 μm , (Whatman, Maidstone, Reino Unido). Se utilizó un equipo de CLAR (Waters e2695 Separation Module, Milford, EUA) con un detector de índice de refracción (Waters 2414, Milford, EUA). La muestra se inyectó en una columna CH Pb (7.8 x 300 mm, Waters, Milford, MA, EUA) y se utilizó una elución isocrática con agua a un flujo de 0.4 mL/min a 70 °C.

Contenido de AF, di-AF y tri-AF

La cuantificación de AF, di-AF y tri-AF en AX se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (CLAR-FR), de acuerdo con Vansteenkiste *et al.* (2004). A 100 mg de AX se agregaron 10 mL de NaOH 2N y la mezcla se mantuvo en agitación a 100 rpm y 25 °C (KS 3000 ic control, IKA, NC, EUA) durante 2 h en atmósfera de nitrógeno y ausencia de luz. Posteriormente, la mezcla se neutralizó con 1 mL de HCl 2N. Después se agregaron 5 mL de éter etílico, se centrifugó a 1000 g, 20 °C y 5 min, y el sobrenadante se recuperó en ausencia de luz. Nuevamente, la muestra se trató con 5 mL de éter etílico, se centrifugó y se recuperó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. El sobrenadante recuperado fue evaporado a 35 °C bajo flujo de nitrógeno y el concentrado se resuspendió en 1 mL de mezcla agua:metanol:ácido acético (60:30:10 v/v) y se filtró (0.45 μm , Whatman, Maidstone, Reino Unido). Los extractos se inyectaron en una columna Altima C18 (250mm x 4.6 mm, Alltech Associates, Inc., Deerfield, EUA) colocada en un equipo CLAR (Waters e2695 Separation Module, Milford, EUA) acoplado un detector de arreglo de diodos (Waters 2998, Milford, EUA) a una longitud de onda de 320 nm.

Viscosidad intrínseca y peso molecular viscosimétrico

La viscosidad intrínseca $[\eta]$ de los AX fue determinada mediante viscosimetría capilar con temperatura controlada utilizando un capilar Ubbelohde mediante el método de Mead, Kraemer y Fouss (Carvajal-Millan *et al.*, 2007).

2.3 Gelificación de AX

La formación de geles de AX se llevó a cabo por el método enzimático (Fig. 1) utilizando lacasa de *Trametes versicolor* (E.C.1.10.3.2) o peroxidasa de rábano (E.C.1.11.1.7). Se preparó una dispersión de AX al 2% (p/v) en una solución reguladora de citrato-fosfato 0.5 M a pH 5. Los geles de AX formados con lacasa se prepararon agregando 0.1 U de enzima por mg de AX, mientras que para los geles inducidos con peroxidasa se añadió 0.1 U por mg de AX y 1.5 μmol de H_2O_2 por mg AX (Martínez-López *et al.*, 2019).

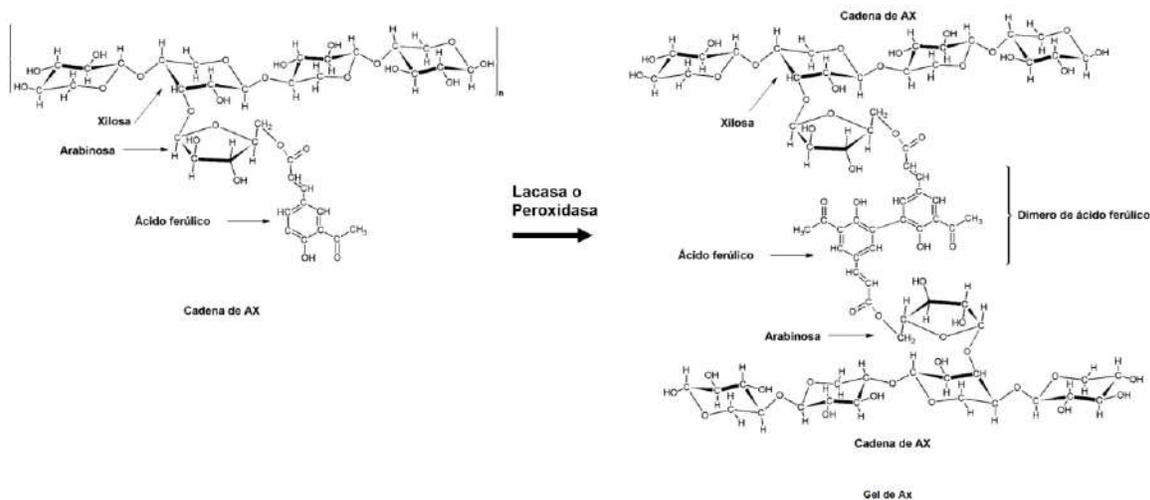


Figura 1. Esquema representativo que describe la gelificación de AX por vía enzimática.

Figure 1. Representative scheme describing the gelation of AX by the enzymatic route.

Fuente: Modificado a partir de Mendez-Encinas *et al.* (2019a).

Contenido de AF, di-AF y tri-AF en los geles

La cuantificación de AF, di-AF y tri-AF en los geles de AX se realizó mediante CLAR-FR (Vansteenkiste *et al.*, 2004). A 100 mg de gel previamente liofilizado (Freezone 6 Labconco, Kansas, Missouri, EUA) por 24 h a $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 0.133 mbar se agregaron 10 mL de NaOH 2N. La muestra se mantuvo en agitación (100 rpm, 2h, 25 $^{\circ}\text{C}$) (KS 3000 ic control, IKA, NC, EUA) en atmósfera de nitrógeno y ausencia de luz. La mezcla se neutralizó (1 mL de HCl 2N), se agregaron 5 mL de éter

etílico, se centrifugó a 1000 g, 20 °C y 5 min, y el sobrenadante se recuperó en ausencia de luz. Se agregó de nuevo 5 mL de éter etílico y se repitió la centrifugación y recuperación de sobrenadante. Los sobrenadantes recuperados fueron evaporados a 35 °C bajo flujo de nitrógeno y el concentrado se resuspendió en 1 mL de mezcla agua:metanol:ácido acético (60:30:10 v/v) y se filtró (0.45 µm, Whatman, Maidstone, Reino Unido). Los filtrados se inyectaron en una columna Altima C18 (250mm x 4.6 mm, Alltech Associates, Inc., Deerfield, EUA) en un equipo CLAR (Waters e2695 Separation Module, Milford, EUA) acoplado un detector de arreglo de diodos (Waters 2998, Milford, EUA) a una longitud de onda de 320 nm.

Reología

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

FT-IR de los geles

Se utilizó espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) (Nicolet iS50 FT-IR, Nicolet Instrument Corp., Madison, WI, EUA) utilizando reflectancia total atenuada (ATR), en modo de absorbancia de 400-4000 cm^{-1} y 4 cm^{-1} de resolución, siguiendo el procedimiento reportado por De Anda-Flores *et al.* (2020). Los geles analizados fueron previamente liofilizados (Freezone 6 Labconco, Kansas, Missouri, EUA) por 24 h a -37 °C y 0.133 mbar.

2.4 Actividad Antioxidante de AX y geles de AX

La actividad antioxidante *in vitro* de AX y sus geles formados vía lacasa o peroxidasa fue analizada utilizando los métodos ABTS⁺ y DPPH. La dispersión de AX se preparó en agua en el rango de 0 a 5 mg/mL mediante agitación en placa durante 12 h a 25 °C. Para la evaluación de los geles estos fueron liofilizados (Freezone 6 Labconco, Kansas, Missouri, EUA) por 24 h a -37 °C y 0.133 mbar. La dispersión de los geles liofilizados se preparó en agua a 5 mg/mL utilizando un homogeneizador ultrasónico (JY92-IIDN, Hinotek, Shanghai, China) a 25 °C, 50 impulsos y 30% de potencia durante 5 min. Se tomaron 400 µl de cada una de las dispersiones y se añadieron 350 µl de metanol y se agitaron manualmente para su posterior análisis.

El método ABTS⁺ se utilizó de acuerdo con lo reportado anteriormente (Rosa *et al.*, 2013; Re *et al.*, 1999). Se utilizaron dispersiones de AX a diferentes concentraciones (0-5 mg/mL). La absorbancia de la muestra y la mezcla de reactivos ABTS⁺ se midieron a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro (Cary 60, Agilent, Santa Clara, EUA) a los 7, 15, 21 y 60 min. Los resultados se reportaron como µmol de Trolox por gramo de muestra (µmol TEAC/g muestra). Se utilizó una curva dosis-respuesta de Trolox de (1-20 µg/mL) para determinar la actividad antioxidante de las muestras.

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

2.5 Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como medias y desviación estándar de tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con nivel de significancia de 0.05 ($p < 0.05$), y una comparación por Tukey-Kramer (Software NCSS versión 2021).

3. Resultados y discusión

3.1 Extracción y Caracterización de AX

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

Las características macromoleculares de los AX obtenidos se presentan en el Tabla 1. Los AX presentaron una proporción arabinosa/xilosa (A/X) de 0.60 ± 0.03 , lo cual indica que la estructura del polisacárido se encuentra moderadamente ramificada con arabinosas. El contenido de AF fue de 5.0 ± 0.4 (µg/g AX), menor al reportado en investigaciones previas con tiempos más cortos de hidrólisis alcalina (De Anda-Flores *et al.*, 2020; Mendez-Encinas *et al.*, 2018). No fueron detectados di-AF ni tri-AF en el polisacárido a diferencia de otras investigaciones, donde se ha reportado la presencia de los di-AF 5-5', 8-5' y 8-O-4' (Marquez-Escalante *et al.*, 2019; Mendez-Encinas *et al.*, 2019 a, b). Estas diferencias se pueden atribuir al tiempo más prolongado de hidrólisis alcalina (2 h) del presente estudio, en comparación con tiempos más cortos (15, 30 y 60 min) utilizados en investigaciones previas, ya que el grado de saponificación de los enlaces éster entre AF y arabinosas es mayor al aumentar el tiempo de exposición a pH alcalino.



Figura 2. AX extraídos de DDGS.
Figure 2. AX extracted from DDGS.

Tabla 1. Características macromoleculares de AX extraídos de DDGS.
Table 1. Macromolecular characteristics of AX extracted from DDGS.

Característica	Valor
Proporción A/X	0.60 ± 0.03
Ácido ferúlico ($\mu\text{g/g}$ AX)	5.0 ± 0.4
di-AF ($\mu\text{g/g}$ AX)	Nd
tri-AF ($\mu\text{g/g}$ AX)	Nd
Viscosidad intrínseca $[\eta]$ (mL/g)	114 ± 13
Peso molecular viscosimétrico (Mv) kDa	368 ± 35

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

El espectro FT-IR de los AX se muestra en la Fig. 3 donde se observa una región característica para este polisacárido entre 1200 y 800 cm^{-1} . La banda principal centrada en 1035 cm^{-1} ha sido anteriormente asignada a la flexión C-OH con un pequeño hombro 995 cm^{-1} relacionado con el estiramiento C-O-C antisimétrico del enlace glucosídico $\beta(1-4)$ de las xilosas que forman la cadena principal de los AX (Barron y Rouau, 2008). La banda a 1720 cm^{-1} ha sido relacionada con el enlace éster y con la vibración del enlace C=C como se ha reportado para el espectro infrarrojo del AF (Kacurakova et al 1999). También se registró una banda en 3413 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos OH y en 2854 cm^{-1} asignada a los grupos CH_2 . Este espectro FT-IR es similar al reportado por otros autores para AX (Mendez-Encinas et al. 2019a).

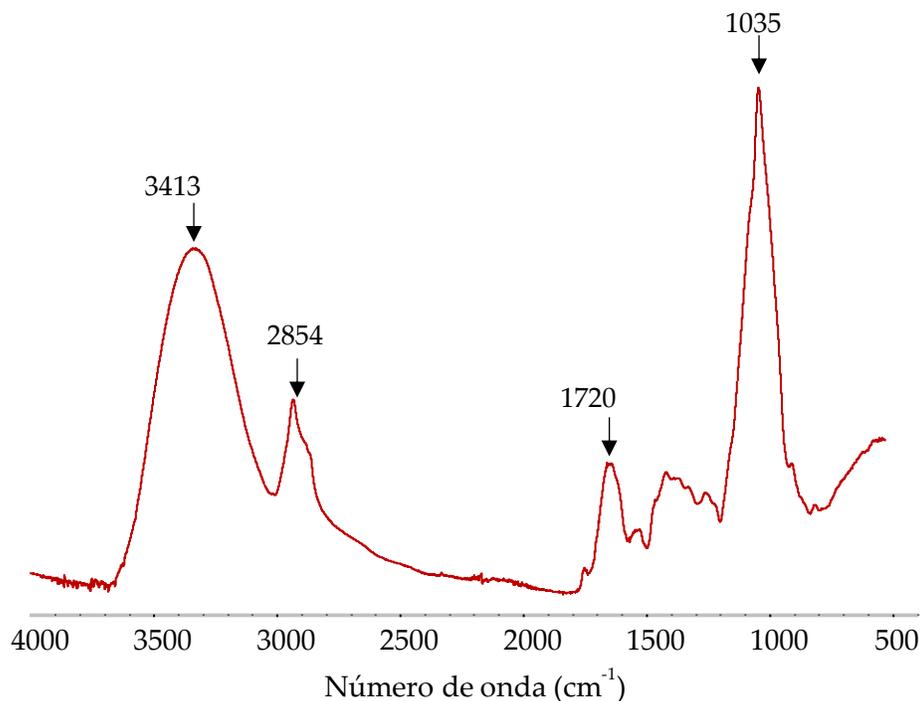


Figura 3. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier de AX obtenidos de DDGS.
Figure 3. Fourier transform infrared spectrum for AX from DDGS.

3.2 Gelificación de AX

FT-IR

El espectro FT-IR de los geles de AX (Fig. 4) es similar al de los AX no entrecruzados (Fig. 3) con la región característica entre 1200 y 900 cm^{-1} y la banda de absorción máxima a 1035 cm^{-1} relacionada con los enlaces glicosídicos β -(1-4) de la cadena de xilosas en este polisacárido. Se observa también la banda a 3413 cm^{-1} atribuida a los grupos OH y la de 2854 cm^{-1} asignada a los grupos CH_2 . Por otro lado, los espectros de los geles de AX formados con lacasa y con peroxidasa presentaron bandas mejor definidas y de mayor intensidad a 1573 cm^{-1} y 1414 cm^{-1} en relación con el espectro de AX. Estas bandas han sido asociadas al estiramiento asimétrico del CO y relacionadas con un aumento en la vibración de los grupos éster (Mendez-Encinas *et al.* 2019b). Estas diferencias se atribuyen al acoplamiento oxidativo (vía lacasa o peroxidasa) entre las cadenas de polisacárido. Estos espectros coinciden con los reportados por otros autores para AX gelificados (Mendez-Encinas *et al.* 2019 a, b; González-Estrada *et al.*, 2015).

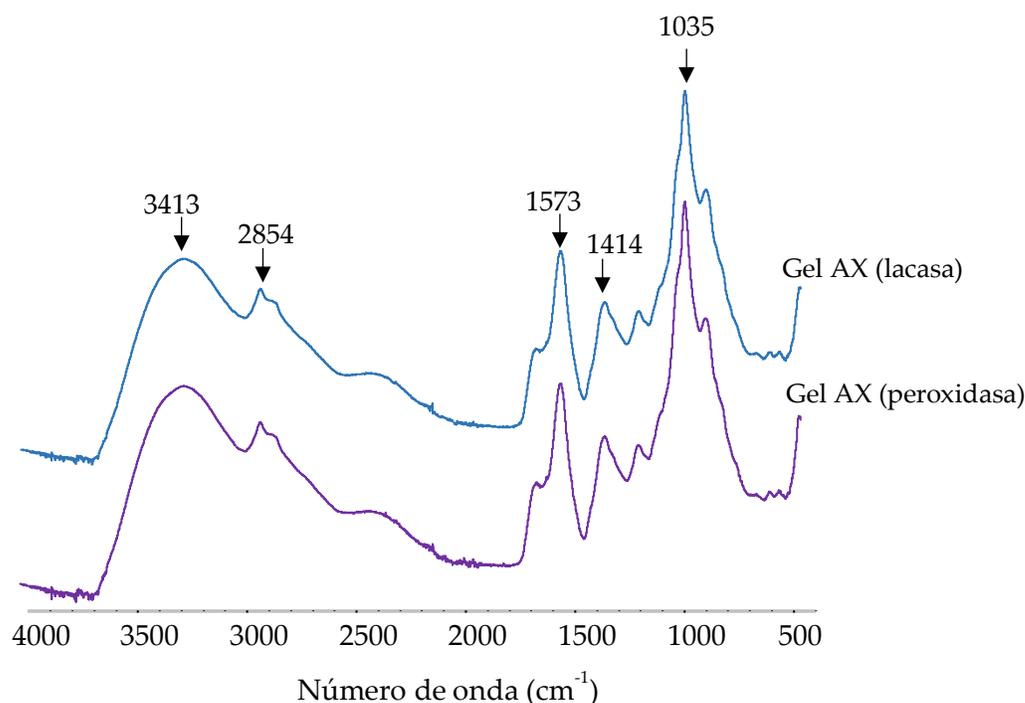


Figura 4. Espectro infrarrojo con transformada de Fourier de geles de AX inducidos con lacasa o peroxidasa.
Figure 4. Fourier transform infrared spectrum for AX gels induced with laccase or peroxidase.

Contenido de AF, di-AF y tri-AF

Después del proceso de gelificación de los AX, el AF se oxidó en un 94% al utilizar la enzima lacasa o peroxidasa como agente entrecruzante. No se presentaron diferencias significativas respecto al contenido de tri-AF en los geles de AX formados, pero aquellos inducidos con peroxidasa presentaron un mayor contenido de di-AF respecto a los geles formados con lacasa (Tabla 2).

En el gel formado con lacasa se presentó el isómero 8-5' como el di-AF mayoritario (61%), seguido del di-AF 8-O-4' (20%) y el di-AF 5-5' (19%). En los geles formados con peroxidasa se presentaron los isómeros de di-AF en el siguiente orden: 8-5', 5-5' y 8-O-4' en un 59%, 25% y 16%, respectivamente (Tabla 3). Estos resultados son similares a los reportados por Martínez-López *et al.* (2019).

Tabla 2. Contenido de AF, di-AF y tri-AF en AX y geles de AX inducidos con lacasa o peroxidasa.

Table 2. Content of AF, di-AF and tri-AF in AX and AX gels induced with laccase or peroxidase.

Muestra	AF ($\mu\text{g/g}$)	di-FA ($\mu\text{g/g}$)	tri-FA ($\mu\text{g/g}$)
AX	5.00 ± 0.40^a	Nd	Nd
Gel AX (lacasa)	0.30 ± 0.03^b	0.153 ± 0.010^b	0.020 ± 0.001^a
Gel AX (peroxidasa)	0.31 ± 0.01^b	0.195 ± 0.010^a	0.020 ± 0.001^a

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

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

Tabla 3. Composición de isómeros de di-FA en geles de AX.

Table 3. Composition of di-FA isomers in AX gels.

Muestra	8-5' ($\mu\text{g/g}$)	8-O-4' ($\mu\text{g/g}$)	5-5' ($\mu\text{g/g}$)
Gel AX (lacasa)	0.093 ± 0.001^b	0.030 ± 0.001^a	0.030 ± 0.001^b
Gel AX (peroxidasa)	0.116 ± 0.001^a	0.032 ± 0.001^a	0.047 ± 0.001^a

Valores medios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

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

Reología

Cinética de gelificación

La Fig. 5 muestra la evolución del módulo de elasticidad (G') y el módulo de viscosidad (G'') de las soluciones de AX al 2 % (p/v) tratadas con lacasa o peroxidasa en función del tiempo. Para ambos sistemas de gelificación se obtuvo un comportamiento similar con un incremento de G' en

función del tiempo hasta alcanzar un pseudo *plateau*. Al final de la cinética, los geles presentaron valores de G' y G'' de 79 y 0.3 Pa para lacasa, respectivamente, mientras que para peroxidasa esos valores fueron de 94 y 0.4 Pa, respectivamente. Estos valores están dentro del rango reportado para otros geles de AX extraídos de DDGS (Mendez-Encinas *et al.*, 2019a; Marquez-Escalante *et al.*, 2019). Las características viscoelásticas de los geles estudiados se resumen en la Tabla 4. Los valores bajos de la tangente delta confirman que los materiales son predominantemente elásticos.

El mayor valor de G' en geles formados con peroxidasa puede atribuirse al mayor contenido de di-FA en este material (0.195 $\mu\text{g/g}$ AX) respecto al obtenido al utilizar lacasa como entrecruzante (0.153 $\mu\text{g/g}$ AX) como se describió en la Tabla 2. En relación con los isómeros de di-AF formados, en los geles formados con peroxidasa fue más alta la proporción de estructuras 8-5' y 5-5'. De acuerdo con Hatfield y Ralph (1999), el di-AF 5-5' es el único isómero relacionado con la formación de uniones tanto inter como intra-cadena de AX. Los isómeros 8-5' y 8-O-4' forman solamente uniones inter cadena de AX. Así, los di-AF 8-5' contribuyen de manera efectiva a la elasticidad a la red polimérica del gel lo cual explica el mayor valor de G' en estos geles formados con peroxidasa.

Las diferencias encontradas en las estructuras de entrecruzamiento y las características reológicas de los geles de AX formados con lacasa o con peroxidasa podrían estar relacionados con los mecanismos de acción de estas enzimas. La lacasa cataliza la oxidación de AF esterificado en el AX por la interacción entre el O_2 y el cobre presente en la enzima, lo que resulta en una reacción retardada. En la catálisis con peroxidasa, el H_2O_2 actúa en la primera etapa de la reacción y, dado su menor peso molecular, puede acceder más fácilmente al AF de los AX, favoreciendo así el acoplamiento oxidativo entre las cadenas. Esto podría explicar el mayor contenido de di-AF en geles obtenidos con peroxidasa respecto al generado con lacasa (Martínez-López *et al.*, 2019).

Espectro mecánico y barrido de deformación en geles de AX

Los espectros mecánicos y barridos de deformación de los geles de AX formados por lacasa o peroxidasa después de una hora a 25 °C se muestran en las Fig. 6 y 7. En estos gráficos se observa un comportamiento típico de un material viscoelástico con valores de G' lineales e independientes de la frecuencia de deformación y valores de G'' menores y dependientes de la frecuencia. Este comportamiento es similar a lo reportado anteriormente para geles de AX inducidos por lacasa o peroxidasa (Martínez-López *et al.*, 2019). Los valores de tangente delta (G''/G') son menores a 1, indicando la presencia de un sistema predominantemente elástico (Ross-Murphy, 1984). En las Tablas 4 y 5 se presentan las características viscoelásticas de los geles a 0.25 Hz y a 5% de deformación, respectivamente, las cuales son las condiciones utilizadas en la cinética de gelificación (Fig. 5).

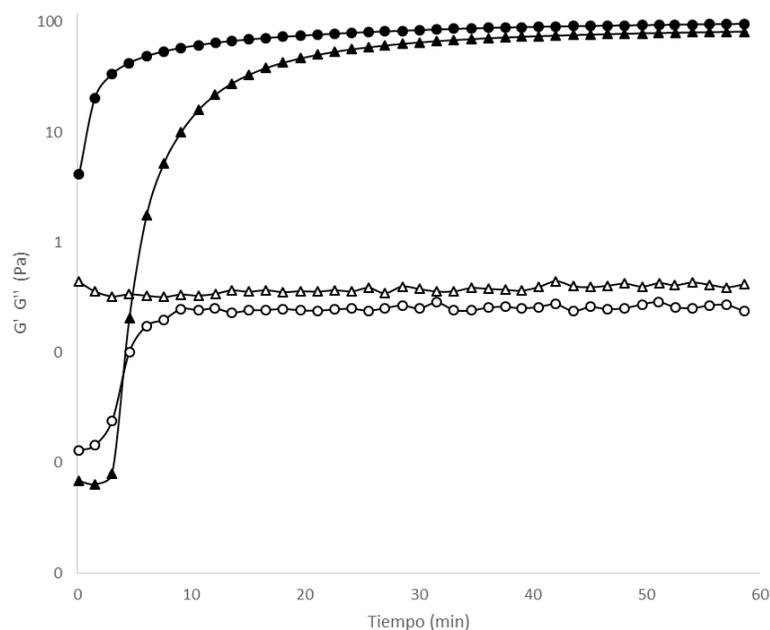


Figura 5. Cinética de gelificación para soluciones de AX al 2% (p/v) inducida con lacasa o peroxidasa. Mediciones a 0.25 Hz, 5% de deformación y 25 °C. Lacasa (G' ▲, G'' △); peroxidasa (G' ●, G'' ○). Promedio de tres repeticiones.

Figure 5. Gelation kinetics for 2% (w/v) AX solutions induced with laccase or peroxidase. Measurements at 0.25 Hz, 5% strain and 25 °C. Laccase (G' ▲, G'' △); peroxidase (G' ●, G'' ○). Average of three repetitions.

Tabla 4. Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa al final de la gelificación a 0.25 Hz y 5% de deformación.

Table 4. Viscoelastic characteristics of 2% (w/v) AX gels induced with laccase or peroxidase at the end of gelation at 0.25 Hz and 5% strain.

Muestra	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tangente delta (G''/G')
Gel AX (lacasa)	79 ± 7^b	0.30 ± 0.03^b	0.003 ± 0.001^a
Gel AX (peroxidasa)	94 ± 5^a	0.41 ± 0.01^a	0.004 ± 0.002^a

Valores medios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

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

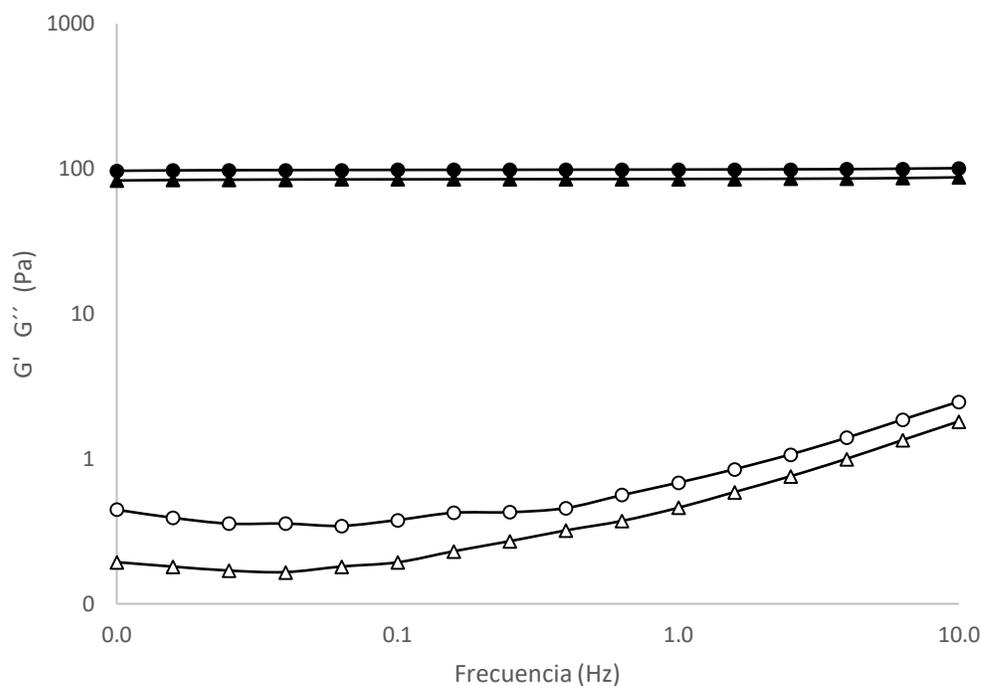


Figura 6. Barrido de frecuencia de geles de AX al 2% (p/v) entrecruzados vía lacasa o peroxidasa. Mediciones a 5% de deformación y 25 °C. Lacasa ($G' \blacktriangle$, $G'' \triangle$); peroxidasa ($G' \bullet$, $G'' \circ$). Promedio de tres repeticiones.

Figure 6. Frequency sweep of 2% (w/v) AX gels crosslinked via laccase or peroxidase. Measurements at 5% strain and 25 °C. Laccase ($G' \blacktriangle$, $G'' \triangle$); peroxidase ($G' \bullet$, $G'' \circ$). Average of three repetitions.

Tabla 5. Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa al final del barrido de frecuencia. Valores a 0.25 Hz en el barrido de frecuencia.

Table 5. Viscoelastic characteristics of 2% (w/v) AX gels induced with laccase or peroxidase at the end of the frequency sweep. Values at 0.25 Hz in the frequency sweep.

Muestra	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tangente delta G''/G'
Gel AX (lacasa)	85 ± 6^b	0.32 ± 0.05^a	0.003 ± 0.001^a
Gel AX (peroxidasa)	98 ± 6^a	0.45 ± 0.08^a	0.004 ± 0.001^a

Valores medios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

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

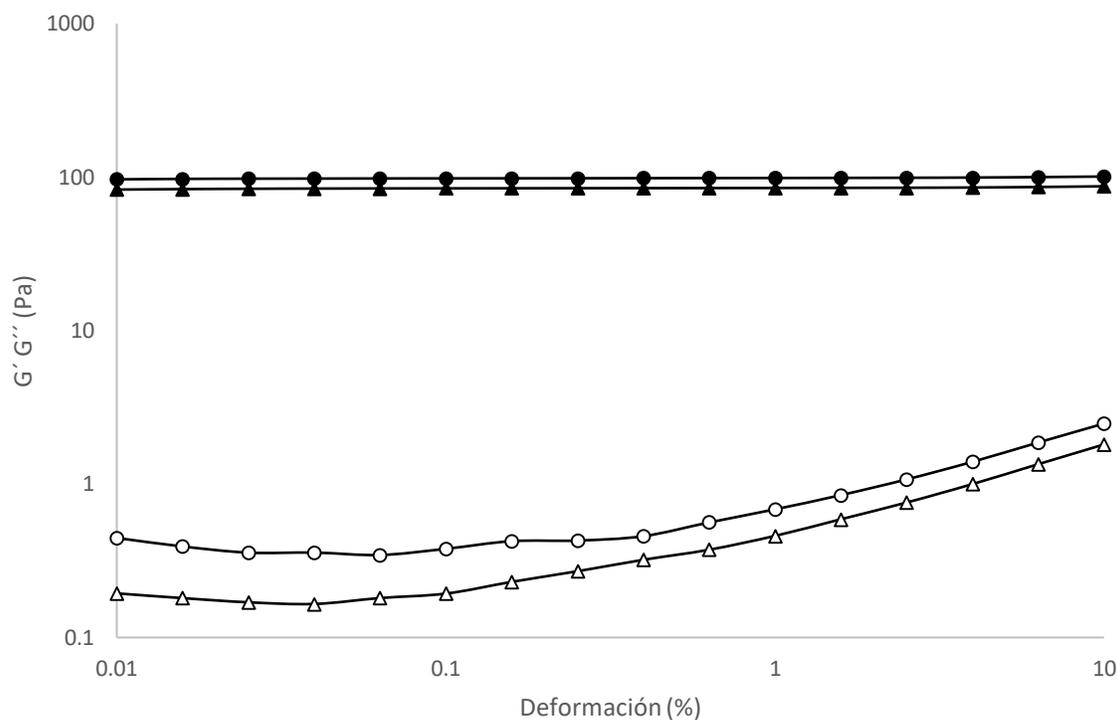


Figura 7. Barrido de deformación en geles de AX al 2% (p/v) formados con lacasa o peroxidasa. Mediciones a 0.25 Hz y 25 °C. Lacasa (G' ▲, G'' △); peroxidasa (G' ●, G'' ○). Promedio de tres repeticiones.

Figure 7. Deformation sweep for 2% (w/v) AX gels formed with laccase or peroxidase. Measurements at 0.25 Hz and 25 °C. Laccase (G' ▲, G'' △); peroxidase (G' ●, G'' ○). Average of three repetitions.

Tabla 6. Características viscoelásticas de geles de AX al 2% (p/v) inducidos con lacasa o peroxidasa. Valores a 5% en el barrido de deformación.

Table 6. Viscoelastic characteristics of 2% (w/v) AX gels induced with laccase or peroxidase. Values at 5% in the deformation sweep.

Muestra	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tangente delta G''/G'
Gel AX (lacasa)	85 ± 6 ^b	1.4 ± 0.1 ^b	0.015 ± 0.001 ^b
Gel AX (peroxidasa)	99 ± 6 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	0.019 ± 0.001 ^a

Valores medios de tres repeticiones ± desviación estándar.

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

Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante de los AX y los geles de AX inducidos con lacasa o peroxidasa, determinada por el método ABTS+ y DPPH se presenta en el Tabla 7. Tanto al utilizar el método ABTS+ como el método DPPH los AX y los AX gelificados presentaron actividad antioxidante. Los valores registrados por el método ABTS+ fueron más altos que los obtenidos con el método DPPH. Este efecto ya ha sido anteriormente reportado y se ha relacionado con una mayor afinidad del radical fenoxilo hacia el radical ABTS+, ya que este radical es un catión inestable que reacciona con antioxidantes generando compuestos que también poseen actividad antioxidante, lo que conduce a la sobreestimación de los resultados obtenidos de actividad antioxidante en una muestra. Por el contrario, el radical DPPH es relativamente estable y puede reducirse fácilmente extrayendo hidrógeno de moléculas donantes (Marquez-Escalante *et al.*, 2019). Los geles de AX inducidos con peroxidasa como entrecruzante presentaron una actividad antioxidante mayor que los formados con lacasa. Este resultado podría estar relacionado con el mayor contenido de di-AF en los geles formados con peroxidasa, en particular de las estructuras isoméricas 8-5' y 5-5', lo cual concuerda con el reporte de Jia *et al.* (2018), quien encontró que los di-AF 8-5' y 5-5' presentan mayor actividad antioxidante.

Tabla 7. Actividad antioxidante de AX y geles de AX inducidos por lacasa o peroxidasa.
Table 7. Antioxidant activity of AX and AX gels induced by laccase or peroxidase.

Muestra	ABTS+ (μmol de TEAC/g muestra)	DPPH (μmol TEAC/g muestra)
AX	16.99 \pm 0.37 ^a	4.2 \pm 0.1 ^a
Gel de AX (lacasa)	9.63 \pm 0.07 ^c	3.0 \pm 0.1 ^c
Gel de AX (peroxidasa)	13.21 \pm 0.28 ^b	3.3 \pm 0.1 ^b

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

Valores promedios de tres repeticiones \pm desviación estándar.

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

4. Conclusiones

Los AX obtenidos de DDGS presentan características moleculares que les permiten formar geles inducidos por lacasa y peroxidasa. Los geles obtenidos con peroxidasa presentan un mayor contenido de estructuras de entrecruzamiento, así como un módulo elástico y una actividad antioxidante más elevados respecto a los generados con lacasa. La diferencia en el contenido de di-AF en los geles de AX formados con estas enzimas podría estar relacionada con el mecanismo de

acción de las mismas. La mayor elasticidad de los geles formados con peroxidasa se atribuye al contenido de di-AF en estos materiales mientras que el valor más alto de actividad antioxidante podría relacionarse con la proporción más elevada de isómeros 8-5' y 5-5'. Los resultados indican que los AX desarrollan distinto contenido y formas de estructuras de entrecruzamiento, así como diferentes características reológicas y propiedades antioxidantes en función del sistema enzimático de gelificación utilizado. Bajo esta perspectiva, los resultados del presente estudio permiten plantear la posibilidad de tratar los AX con distintos agentes entrecruzantes para diseñar materiales con características y propiedades específicas para el área alimenticia, biomédica y farmacéutica, entre otras.

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por el Fondo de apoyo para el fomento de la investigación sobre la región Sonora-Arizona en México 2019 (clave 20614, proyecto aprobado a E. Carvajal-Millan).

Conflicto de interés

Los autores señalan que no existe conflicto de intereses en la publicación de estos resultados.

Nomenclatura

AX	Arabinosilanos ferulados
DDGS	Distillers Dried Grains with Solubles/Granos secos de destilería con solubles
AF	Ácido ferúlico
di-AF	Dímeros de ácido ferúlico
tri-AF	Trímeros de ácido ferúlico
FT-IR	Fourier Transform Infrared/Transformada de Fourier para infrarrojos
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
G'	Módulo elástico
G''	Módulo viscoso
Pa	Pascal
DPPH	α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

Trolox	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TEAC	Trolox-Equivalent Antioxidant Activity/Actividad antioxidante equivalente de Trolox
ATR	Attenuated Total Reflection/Reflectancia total atenuada
[η]	Viscosidad intrínseca

5. Referencias

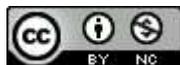
- Barron C. & X. Rouau. 2008. FTIR and Raman Signatures of Wheat Grain Peripheral Tissues. *Cereal Chemistry* 85, 619-625. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-5-0619>
- Carvajal-Millan E., A Rascón-Chu., J. Márquez-Escalante, N.Ponce de León, V. Micard & A. Gardea. 2007. Maize bran gum: extraction, characterization and functional properties. *Carbohydr. Polym.* 69(2): 280-285. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.10.006>
- De Anda-Flores Y., E. Carvajal-Millan, J. Lizardi-Mendoza, A. Rascon-Chu, A.L. Martínez-López, J. Marquez-Escalante, F.Brown-Bojorquez & J. Tanori-Cordova. 2020. Covalently crosslinked nanoparticles based on ferulated arabinoxylans recovered from a distiller's dried grains byproduct. *Processes* 8(6), 691-705; <https://doi.org/10.3390/pr8060691>
- Fierro Islas J.M., E. Carvajal Millán, A.C. Campa Mada, J.A. Márquez Escalante & A. Rascón Chu. 2018. El subproducto del bioetanol de maíz como fuente de arabinoxilanos para la industria alimentaria. *Industria Alimentaria* 40(6), 34-43. https://issuu.com/alfaeditorestecnicos/docs/industria_alimentaria_noviembredic_8c7ac60a927c70
- González-Estrada R., M. Calderón-Santoyo, E. Carvajal-Millan, F.D.J.A., Valle, J.A. Ragazzo-Sánchez, F. Brown-Bojorquez & A. Rascón-Chu. 2015. Covalently cross-linked arabinoxylans films for *Debaryomyces hansenii* entrapment. *Molecules* 20 (6), 11373-11386. <https://doi.org/10.3390/molecules200611373>
- Hatfield R.D. & J. Ralph. 1999. Modelling the feasibility of intramolecular dehydrodiferulate formation in grass walls. *J. Sci. Food Agric.* 79: 425-427. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<425::AID-SF425>3.0.CO;2-3)
- Jia Y., Y. He & F. Lu. 2018. The structure-antioxidant activity relationship of dehydrodiferulates. *Food Chem.* 269:480-485. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.038>
- Kacurakova M., N. Wellner, A. Ebringerova, Z. Hromadkova, R. H. Wilson & P.S. Belton. 1999. Characterisation of xylan-type polysaccharides and associated cell wall components by FT-IR and FT-Raman spectroscopies. *Food Hydrocoll.* 13:35-41. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(98\)00067-8](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(98)00067-8)
- Knudsen K.E.B. & H.N. Lærke. 2010. REVIEW: Rye arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties and physiological effects in the gastrointestinal tract. *Cereal Chem.* 87: 353-362. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-87-4-0353>

- Malunga L.N. & T. Beta. 2015. Antioxidant capacity of water-extractable arabinoxylan from commercial barley, wheat, and wheat fractions. *Cereal Chem.* 92(1):29-36. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-11-13-0247-R>
- Marquez-Escalante J., E. Carvajal-Millan, Y.L. López-Franco, E.M. Valenzuela-Soto & A. Rascón-Chu. 2018. Efecto prebiótico de los arabinoxilanos y los arabinoxilo-oligosacáridos y su relación con la promoción de la buena salud / Prebiotic effect of arabinoxylans and arabinoxylan-oligosaccharides and the relationship with good health promotion. *CienciaUAT* 13(1):146-164. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i1.922>
- Marquez-Escalante J.A. & E. Carvajal-Millan 2019. Feruloylated arabinoxylans from maize distiller's dried grains with solubles: effect of feruloyl esterase on their macromolecular characteristics, gelling, and antioxidant properties. *Sustainability* 11(22):6449-6461; <https://doi.org/10.3390/su11226449>
- Martínez-López A.L., E. Carvajal-Millan, J. Marquez-Escalante, A.C. Campa-Mada, A. Rascón-Chu, Y.L. López-Franco & J. Lizardi-Mendoza. 2019. Enzymatic crosslinking of ferulated arabinoxylan: effect of laccase or peroxidase catalysis on the gel characteristics. *Food Sci. Biotechnol.* 28(2):311-318. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0488-9>
- Melo-Silveira R. F., R. L. Silva-Viana, D. Araujo-Sabry, R. A Da Silva., D. Machado, A. K. Lima-Nascimento, K. Castanho-Scortecci., C.V. Ferreira-Halder, G. Lanzi-Sasaki. & H.A.Oliveira Rocha. 2019. Antiproliferative xylan from corn cobs induces apoptosis in tumor cells. *Carbohydr. Polym.* 210:245-253. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.073>
- Mendez-Encinas M.A., E. Carvajal-Millan, M.P. Yadav, Y.L. López-Franco, A. Rascon-Chu, J. Lizardi-Mendoza, F. Brown-Bojorquez, E. Silva-Campa & M. Pedroza-Montero. 2019a. Partial removal of protein associated with arabinoxylans: Impact on the viscoelasticity, crosslinking content, and microstructure of the gels formed. *J. Appl. Polym. Sci.* 136(15), 47300. <https://doi.org/10.1002/app.47300>
- Mendez-Encinas M.A., E. Carvajal-Millan, A. Rascón-Chu, H. Astiazarán-García, D.E. Valencia-Rivera, F. Brown-Bojorquez, E. Alday & C. Velazquez. 2019b. Arabinoxylan-based particles: *in vitro* antioxidant capacity and cytotoxicity on a human colon cell line. *Medicina* 55 (7):349. <https://doi.org/10.3390/medicina55070349>
- Mendez-Encinas M.A., E. Carvajal-Millan, A. Rascon-Chu, H. Astiazaran-García, & D.E. Valencia-Rivera. 2018. Ferulated Arabinoxylans and Their Gels: Functional Properties and Potential Application as Antioxidant and Anticancer Agent, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Article ID 2314759. <https://doi.org/10.1155/2018/2314759> Izy
- Mendis M., E. Leclerc & S. Simsek. 2016. Arabinoxylans, gut microbiota and immunity. *Carbohydr. Polym.* 139:159-166. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.068>
- Niño-Medina G., E. Carvajal-Millán, A. Rascon-Chu, J.A. Marquez-Escalante, V. Guerrero & E. Salas-Muñoz. 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels : structure, sources and applications. *Phytochem Rev.* 9 : 111-120. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9147-3>
- Re R., Pellegrini N., A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang & C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9-10):1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

- Rosa N. N., C. Barron, C. Gaiani, C. Dufour & V.J. Micard. 2013. Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *J. Cereal Sci.* 57(1):84-90. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.10.002>
- Vogel B., D.D: Gallaher & M. Bunzel. 2012. Influence of crosslinked arabinoxylans on the postprandial blood glucose response in rats. *J. Agric. Food Chem.* 60(15):3847-3852. <https://doi.org/10.1021/jf203930a>
- Vansteenkiste E., C .Babot, X. Rouau & V. Micard. 2004. Oxidative gelation of feruloylated arabinoxylan as affected by protein. Influence on protein enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 18(4):557-564. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2003.09.004>

2023 TECNOCENCIA CHIHUAHUA

Esta obra está bajo la Licencia Creative Commons Atribución No Comercial 4.0 Internacional.



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>