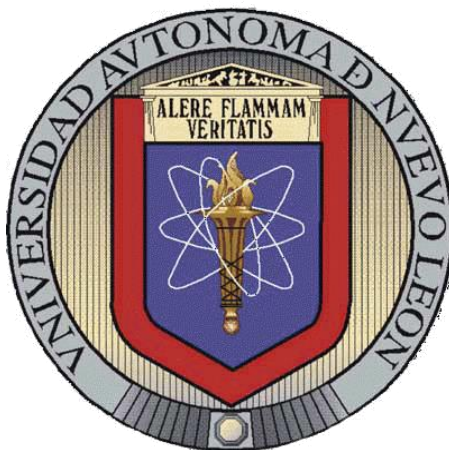


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE ARABINOXILOOLIGOSACÁRIDOS A
PARTIR DE PERICARPIO DE MAÍZ NIXTAMALIZADO Y DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD PREBIÓTICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

Por:

MAGDALENA DE JESÚS ROSTRO ALANIS

Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en Farmacia

JUNIO, 2014

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xix
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Microbiota Intestinal.....	3
1.2 Prebióticos.....	7
1.2.1 Mecanismo de Acción.....	10
1.2.2 Prebióticos Comerciales.....	14
1.2.3 Métodos para Determinar el Carácter Prebiótico.....	16
1.2.3.1 Técnicas de Biología Molecular.....	17
1.2.3.1.1 Hibridación fluorescente <i>in situ</i>	18
1.3 Antioxidantes.....	18
1.3.1 Ácido Ferúlico.....	20
1.4 Oligosacáridos no Digeribles.....	21
1.4.1 Materiales Lignocelulósicos.....	22
1.4.1.1 Celulosa.....	23
1.4.1.2 Hemicelulosa.....	23
1.4.1.3 Lignina.....	24
1.4.2 Arabinoxilano.....	25
1.4.2.1 Estructura del Arabinoxilano.....	25
1.5 Métodos de Obtención de Oligosacáridos.....	27
1.5.1 Residuos Agroindustriales.....	27
1.5.2 Métodos Químicos.....	27
1.5.2.1 Métodos con Ácidos o Bases.....	27
1.5.2.2 Autohidrólisis.....	28

1.5.3 Métodos Biológicos.....	30
1.5.3.1 Tratamientos con Enzimas.....	30
1.5.3.1.1 Enzimas que Degradan el Arabinoxilano.....	31
1.5.3.1.2 Mecanismo de Acción de las Xilanasas.....	32
1.5.3.1.3 Obtención de Oligosacáridos a partir de Enzimas.....	33
1.5.3.2 Tratamientos con Microorganismos.	34
1.5.4 Purificación de Oligosacáridos.....	35
1.5.5 Análisis Estructural de los Oligosacáridos.....	36
Capítulo 2. ANTECEDENTES.....	38
2.1 Industria de la Tortilla.....	38
2.2 Justificación.....	40
Capítulo 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	41
3.1 Hipótesis.....	41
3.2 Objetivo General.....	41
3.3 Objetivos Específicos.....	42
Capítulo 4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
4.1 Materia Prima.....	43
4.2 Hidrólisis Biológica.....	44
4.2.1 Determinación de la Composición Química del Pericarpio de Maíz Nixtamalizado.....	44
4.2.1.1 Determinación de Humedad (H).....	44
4.2.1.2 Determinación del Contenido en Extractos (CE).....	45
4.2.1.3 Hidrólisis Ácida Cuantitativa (HAC).....	45
4.2.1.4 Determinación del Contenido en Lignina de Klason (CLK).....	48
4.2.1.5 Determinación de la Relación de Arabinosa/Xilosa.....	48
4.2.2 Solubilización de Hemicelulosa.....	49
4.2.2.1 Autohidrólisis en Autoclave.....	49
4.2.2.2 Tratamiento Alcalino.....	49
4.2.3 Hidrólisis enzimática.....	50

4.2.3.1 Purificación.....	51
4.3 Hidrólisis Físico-química.....	52
4.3.1 Determinación de la Composición Química del Pericarpio de Maíz Nixtamalizado.....	52
4.3.1.1 Determinación del Contenido en Ceniza (CC).....	52
4.3.1.2 Determinación de Ácidos Urónicos.....	53
4.3.1.3 Determinación del Contenido de Almidón.....	54
4.3.1.4 Determinación del Contenido de Proteína.....	54
4.3.1.5 Determinación del Contenido de Ácido Ferúlico.....	54
4.3.2 Eliminación de Almidón.....	55
4.3.3 Evaluación de relación líquido-sólido (RLS) sobre la Solubilización de la Hemicelulosa por Procesos Autohidrolíticos no Isotérmicos.....	56
4.3.3.1 Generación de Oligosacáridos.....	57
4.3.3.1.1 Determinación del Contenido Seco (CS).....	57
4.3.3.1.2 Análisis Directo de Licores.....	57
4.3.3.1.3 Posthidrólisis.....	58
4.3.3.2 Contenido Fenólico.....	59
4.3.3.3 Actividad Antioxidante.....	61
4.4.3.3.1 Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox....	62
4.4.3.3.2 Poder Reductor.....	62
4.4.3.3.3 Poder Antioxidante de Reducción del Hierro.....	63
4.4.3.3.4 Captación del Radical Libre α,α -difeníl- β -picrilhidrazilo.....	64
4.3.3.4 Evaluación de Oligosacáridos Ferulados.....	64
4.3.3.5 Análisis de los Sólidos después de la Autohidrólisis.....	65
4.3.4 Hidrólisis Enzimática de los Oligosacáridos presentes en los Licores de Autohidrólisis.....	65
4.3.4.1 Prehidrólisis.....	66
4.3.4.2 Selección de Enzimas.....	66
4.3.5 Purificación de Oligosacáridos.....	67
4.3.5.1 Selección de Membrana.....	67
4.3.5.2 Diafiltración Continua.....	70

4.3.6	Caracterización Química de Oligosacáridos.....	70
4.3.6.1	Cromatografía de Permeación en Gel de Alto Rendimiento.....	71
4.3.6.2	Cromatografía de Intercambio Aniónico.....	71
4.3.6.3	Espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	72
4.3.7	Evaluación de la Actividad Biológica de los Oligosacáridos <i>in vitro</i>	73
4.3.7.1	Determinación de la Actividad Prebiótica de Oligosacáridos en Estudios <i>in vitro</i>	73
4.3.7.1.1	Consumo de Oligosacáridos.....	75
4.3.7.1.2	Generación de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC) y lactato.....	75
4.3.7.1.3	Efecto Bifidogénico.....	75
4.3.7.2	Efecto de la Concentración de Oligosacáridos en la Actividad Antioxidante.....	77
4.4	Análisis de Oligosacáridos.....	78
4.4.1	Azúcares reductores.....	78
4.4.1.1	Método del Ácido 3,5 dinitrosalicílico.....	78
4.4.1.2	Método de Somogyi- Nelson.	79
4.4.2	Carbohidratos Totales.....	79
4.4.3	Cromatografía en Capa Fina.....	80
4.4.4	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	80
4.4.4.1	CLAR- IR.	80
4.4.4.2	CLAR- DAD.....	81
4.5	Análisis Estadístico.....	81
4.6	Disposición de Residuos.....	82
	Capítulo 5. RESULTADOS.....	83
5.1	Hidrólisis Biológica.....	83
5.1.1	Pericarpio de Maíz Nixtamalizado.....	83
5.1.2	Solubilización de Hemicelulosa.....	84
5.1.2.1	Autohidrólisis en Autoclave.....	85

5.1.2.2 Tratamiento Alcalino.....	88
5.1.3 Obtención de Oligosacáridos.....	90
5.1.3.1 Hidrólisis enzimática.	90
5.1.3.2 Obtención y Purificación de Oligosacárido.....	96
5.1.3.3 Caracterización Parcial del Oligosacárido Obtenido con la Enzima Veron 191.....	97
5.2 Hidrólisis Físico-química.....	98
5.2.1 Pericarpio de Maíz Nixtamalizado.....	98
5.2.1.1 Contenido en Almidón.....	100
5.2.2 Evaluación de RLS sobre la Solubilización de la Hemicelulosa por Procesos Autohidrolíticos no Isotérmicos.....	103
5.2.2.1 Generación de Oligosacáridos.....	104
5.2.2.2 Contenido Fenólico.....	109
5.2.2.3 Actividad Antioxidante.....	111
5.2.2.4 Evaluación de Oligosacáridos Ferulados.....	116
5.2.2.5 Análisis de los Sólidos después de la Autohidrólisis.....	118
5.2.3 Hidrólisis Enzimática de los Oligosacáridos presentes en los Licores de Autohidrólisis.....	120
5.2.3.1 Prehidrólisis.....	122
5.2.3.2 Selección de Enzimas.....	122
5.2.4 Purificación de Oligosacáridos.....	124
5.2.5 Caracterización Química de Oligosacáridos.....	128
5.2.5.1 Caracterización Estructural de Oligosacárido.....	133
5.2.6 Evaluación de la Actividad Biológica de los Oligosacáridos.....	136
5.2.6.1 Determinación de la Actividad Prebiótica de Oligosacáridos en Estudios <i>in vitro</i>	136
5.2.6.1.1 Consumo de Oligosacáridos.....	136
5.2.6.1.2 Generación de AGCC y Lactato.....	138
5.2.6.1.3 Efecto Bifidogénico.....	143
5.2.6.2 Efecto de la Concentración de Oligosacáridos en la Actividad Antioxidante.	144



Capítulo 6. DISCUSIÓN.....	148
Capítulo 7. CONCLUSIONES.....	158
Bibliografía.....	160
Apéndice 1.....	175

LISTA DE TABLAS

TABLA		Página
I.	Nombre y estructura química de los oligosacáridos	15
II.	Composición química del pericarpio de maíz	39
III.	Valores para parámetros F y C_{Est}	47
IV.	Condiciones de los métodos alcalinos utilizados en la solubilización de hemicelulosa	50
V.	Valores promedio del parámetro F_p	59
VI.	Condiciones de las reacciones enzimáticas de los licores de autohidrólisis	66
VII.	Composición final de medio de cultivo utilizado para la fermentación de oligosacáridos	74
VIII.	Composición del pericarpio de maíz nixtamalizado	84
IX.	Composición del pericarpio de maíz nixtamalizado PMN-C	99
X.	Composición de los sólidos gastados después del pretratamiento a 130°C	102
XI.	Rendimiento de compuestos fenólicos y compuestos solubles en acetato de etilo en los procesos autohidrolíticos no isotérmicos con RLS 8 y 10 (p/p)	110
XII.	AXOS, ácido ferúlico libre y ferulato esterificado	117
XIII.	Composición de los sólidos gastados obtenidos a partir de la autohidrólisis del PMN pre-tratado a diferentes temperaturas con la RLS10 (p/p)	119
IX	Monosacáridos liberados por el proceso de prehidrólisis de los licores de autohidrólisis	120



X	Composición de las fracciones A,B,C,D y E en Figura 5.22	128
XI	Azúcares reductores y relación Ara/Xil de AXOS	132
XII	Cambios en las poblaciones de bacterias en cultivos de fecales en el tiempo.	143

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	Página
1.1 Distribución y composición de las diferentes especies bacterianas en el tracto gastrointestinal.	4
1.2 Visión simplificada de la microbiota del colon.	6
1.3 Mecanismos propuestos para la promoción de la salud en humanos como resultado de la ingestión de prebióticos.	9
1.4 Esquema de la fermentación de proteínas y carbohidratos por la microflora intestinal	11
1.5 Principales vías de producción de los AGCC y otros metabolitos, por fermentación bacteriana, en el lumen del colon.	12
1.6 Estructura química del ácido ferúlico.	21
1.7 Disposición tridimensional de los componentes estructurales dentro de la pared de la célula vegetal.	23
1.8 Estructura del arabinoxilano.	26
1.9 Mecanismo de acción de xilanasas.	33
1.10 Estructura del arabinoxilano de cereales y las enzimas para su hidrólisis.	176
Capítulo 4	
4.1 Esquema experimental de la purificación con tecnología de membranas.	68
4.2 Sistema de operación de la membrana Amicon.	69

Capítulo 5

5.1	Cinética de hidrólisis del pericarpio de maíz nixtamalizado a 24 Lb _f /in ² .	86
5.2	Efecto del tiempo de solubilización en autoclave del PMN sobre la pérdida de ácido ferúlico a 24 Lb _f /in ²	87
5.3	Comparación del rendimiento de hemicelulosa obtenido con los diferentes métodos de tratamiento alcalino para el PMN-A.	88
5.4	Comparación del rendimiento de ácido ferúlico obtenido con los diferentes métodos de tratamiento alcalino para el PMN-A	89
5.5	Comparación de las cinéticas de reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico con la enzima Veron 191.	91
5.6	Placa cromatográfica del seguimiento de la reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico con mayor cantidad de enzima Veron 191.	92
5.7	Cromatograma de CLAR. Reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico del PMN-A con mayor cantidad de enzima.	94
5.8	Cromatograma de CLAR. Estándares de carbohidratos.	94
5.9	Cromatograma de CLAR. Reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico del PMN-B con mayor cantidad de enzima.	95
5.10	Placa cromatográfica de la reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico con la enzima Veron 191.	96

5.11	Perfil de elución de producto por medio de cromatografía de intercambio iónico.	97
5.12	Perfil de temperatura de los procesos autohidrolíticos.	103
5.13	Dependencia del rendimiento de los productos de autohidrólisis no isotérmica del PMN sobre el factor de severidad con RLS 8 (p/p).	105
5.14	Dependencia del rendimiento de los productos de autohidrólisis no isotérmica del PMN sobre el factor de severidad con RLS 10 (p/p).	106
5.15	Dependencia del rendimiento de los productos de autohidrólisis no isotérmica del PMN sobre el factor de severidad con RLS 12 (p/p).	107
5.16	Comparación de las actividades antioxidantes de los licores de autohidrólisis y extractos de acetato de etilo.	112
5.17	Dependencia de la EC_{50} (medición de la capacidad antioxidante de los extractos de acetato de etilo) sobre el factor de severidad de los tratamientos autohidrolíticos.	115
5.18	Cromatogramas de HPSEC de la prehidrólisis del licor de autohidrólisis a 105 °C con H_2SO_4 0.5%.	121
5.19	Cinética de hidrólisis enzimática de licores de autohidrólisis.	122
5.20	Porcentajes de retención de AXOS.	125
5.21	Permeabilidad relativa de las membranas.	126
5.22	Esquema del procesamiento del pericarpio de maíz nixtamalizado para la obtención de AXOS.	127
5.23	Cromatogramas de HPSEC de los AXOS obtenidos.	130
5.24	Espectro de masas AXOS 1.	134

5.25	Espectro de masas AXOS 2.	135
5.26	Consumo de AXOS por microorganismos del inóculo fecal.	137
5.27	Cinética de concentración de AGCC, lactato y valor de pH durante la fermentación de AXOS.	139
5.28	Cinética de concentración de AGCC, lactato y valor de pH durante la fermentación de FOS y agua de AXOS 1.	141
5.29	Cinética de concentración de AGCC, lactato y valor de pH durante la fermentación de FOS y agua de AXOS 2.	142
5.30	Actividad antioxidante de AXOS por el ensayo de FRAP y Poder Reductor.	144
5.31	Actividad antioxidante de AXOS por el ensayo de TEAC.	145
5.32	Actividad antioxidante de AXOS por el ensayo de DFPH.	146

ABREVIATURAS

DFPH	1,1-difenil- 2-picril hidracilo
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
Abs	Absorbancia
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
AF	Ácido ferúlico
ARN	Ácido ribonucleico
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGCR	Ácidos grasos de cadena ramificada
AE	Antes del ensuciamiento
Ara	Arabinosa
AXH	Arabinoxilan-arabinofuranosidasas
AX	Arabinoxilano
AXOS	Arabinoxilooligosacáridos
YNB	Base de levadura de nitrógeno
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
TSB	Caldo de soya tripticasa
ABTS •+	Catión radical [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)]
CFE	Compuestos fenólicos en extractos
Cp, <i>i</i>	Concentración del compuesto <i>i</i> en el permeado

[A] _p	Concentración del monómero A tras la posthidrólisis
[A]	Concentración del monómero en g/L en la fase líquida
$C_{r,i}$	Concentración en el retenido correspondiente
CE ₅₀	Concentración media efectiva
CC	Contenido en cenizas
CE	Contenido en extractos
CLK	Contenido en lignina de Klason
CPs	Contenido en polímeros
CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CPG	Cromatografía de permeación en gel
CCF	Cromatografía en capa fina
ρ	Densidad
MALDI-TOF	Desorción-ionización mediante láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo
DE	Después del ensuciamiento
DL	Después del lavado
DS	Desviación estándar
DAD	Detector de arreglos de diodos
DC	Diafiltración continua
LSD	Diferencia menos significativa
EAA	Equivalentes de ácido ascórbico
EAG	Equivalentes en ácido gálico
C _{Est}	Factor de corrección estequiométrico
R ₀	Factor de severidad
F	Factor que corrige la degradación de los azúcares

FP	Factor que corrige la degradación de los azúcares durante la posthidrólisis
FSAE	Fenoles solubles en acetato de etilo
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FC	Folin Ciocalteu
FOS	Fructooligosacáridos
Fru	Fructosa
Gal	Galactosa
GOS	Glucooligosacáridos
GH	Glucósido hidrolasas
°C	Grado Celsius
GP	Grado de polimerización
g	Gramo
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
HAC	Hidrólisis ácida cuantitativa
HMF	Hidroximetilfurfural
h	Hora
H	Humedad
IR	Índice de refracción
KDa	Kilo Dalton
Kv	Kilo voltios
Lb _f /in ²	Libra fuerza sobre pulgada cuadrada
L	Litros
Log	Logaritmo
Man	Manosa
MLC	Material lignocelulósico
m	Media

<i>m</i> -	Meta
μm	Micrómetros
mM	Mili molar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmol	Milimol
min	Minuto
M	Molaridad
nm	Nanómetros
ng	Nanogramos
ns	Nanosegundos
NR	No reportado
OND	Oligosacáridos no digeribles
OMS	Organización Mundial de la Salud
ω	Parámetro empírico relacionado con la energía de activación
PMN	Pericarpio de maíz nixtamalizado
p	Peso
P	Peso de agua en gramos añadido y corregido para tener en cuenta las pérdidas durante la segunda etapa de HAC.
P _{ácido}	Peso de ácido sulfúrico añadido
PRC	Peso del recipiente con cenizas
PRMS	Peso del recipiente con la muestra seca
PRS	Peso del recipiente seco
PRMH	Peso del recipiente seco con la muestra húmeda inicial
P _{disolución}	Peso total de disolución
PMH	Peso total de muestra húmeda
TMP	Presión transmembrana

PF	Productos fenólicos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RLS	Relación líquido-sólido
[AO]	Representa la concentración de la especie A en los oligosacáridos equivalente en monómeros
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SMA	Agar sabouraud maltosa
SSAE	Sólidos solubles en acetato de etilo
Sor	Sorbitol
PBS	Tampón fosfato salino
T	Temperatura
T _{ref}	Temperatura de referencia
t	Tiempo
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente en Trolox
UV	Ultravioleta
U	Unidad
UFC	Unidad formadora de colonias
v	Volumen
VD	Volumen de diafiltración
XOS	Xilooligosacáridos
Xil	Xilosa

RESUMEN

Magdalena de Jesús Rostro Alanis

Fecha de Graduación: Junio, 2014

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ARABINOXILOOLIGOSACÁRIDOS A PARTIR DE PERICARPIO DE MAÍZ NIXTAMALIZADO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD PREBIÓTICA Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Número de páginas: 185

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Farmacia

Área de Estudio: Farmacia

Propósito y Método del Estudio: El empleo de materiales lignocelulósicos, en especial los de carácter agrícola resulta en la obtención de componentes bioactivos como oligosacáridos y compuestos fenólicos. Los oligosacáridos pueden presentar actividad prebiótica. Los prebióticos son compuestos no digeribles que benefician la salud del ser humano. El pericarpio de maíz nixtamalizado (PMN) es un residuo agroindustrial que se genera en grandes cantidades por la industria de la tortilla. El objetivo de estudio fue obtener oligosacáridos a partir de PMN y determinar la actividad prebiótica y actividad antioxidante en estudios *in vitro*. La obtención de oligosacáridos se realizó mediante procesos de autohidrólisis. Se realizó hidrólisis enzimática para disminuir el grado de polimerización de los oligosacáridos obtenidos. La tecnología de membrana fue utilizada para la purificación de los compuestos. Las actividades biológicas fueron evaluadas por separado, el potencial prebiótico se determinó mediante fermentaciones con un inóculo fecal evaluando el consumo de carbohidratos, la generación de lactato y ácidos grasos de cadena corta y el efecto bifidogénico fue evaluado por hibridación fluorescente *in situ*. La actividad antioxidante se evaluó mediante técnicas como capacidad antioxidante equivalente en trolox, poder reductor, poder antioxidante de reducción del hierro y captación del radical libre α, α -difенил- β -picrilhidrazilo. Los oligosacáridos obtenidos a partir del PMN están compuestos químicamente por moléculas de xilosa y arabinosa. El 77% del ácido ferúlico presente en el PMN permanece esterificado a moléculas de arabinoxilooligosacáridos después del tratamiento autohidrolítico e hidrólisis enzimática.

Contribuciones y Conclusiones: Los arabinoxilooligosacáridos obtenidos a partir del PMN presentan actividad antioxidante y actividad prebiótica en estudios *in vitro*. Los arabinoxilooligosacáridos obtenidos se sitúan como compuestos prometedores como nutracéuticos multifuncionales.

Dra. Mónica Noel Sánchez González
Director de Tesis

Dra. María del Rayo Camacho Corona
Co-director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales son un problema mundial de salud pública a pesar de los avances de la medicina.

En el 2008, las enfermedades gastrointestinales infecciosas (principal causa de diarrea) estuvieron dentro de las primeras cinco causas de muerte a nivel mundial con 2.46 millones de decesos, equivalente al 4.3% del total de muertes, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS).¹ En México en el año 2011, ocuparon el lugar 19 de las causas totales de muerte.^{2,3} Este tipo de padecimientos pueden ser tratados con la administración de antibióticos; sin embargo, el mal uso y el abuso de éstos ha provocado aumento en la resistencia bacteriana disminuyendo su efectividad.³

Por otra parte, en la población mexicana, el estreñimiento se presenta entre el 2 y 20%, mientras que en Estados Unidos afecta al menos a 10% de la población y anualmente es responsable de más de 2.5 millones de visitas médicas y de 92,000 hospitalizaciones.^{4,5} En México la prevalencia estimada de estreñimiento crónico es de 14.4%, siendo más frecuente en mujeres jóvenes.⁵

En países de América del Norte y Europa entre 10-15% de la población presenta síndrome de colon irritable.⁶ En México, las cifras se encuentran entre 16 y 35% de la población.⁷

La OMS estimó que la principal causa de muerte en el mundo durante 2008 fue el cáncer con 7.6 millones de casos, equivalente al 13% del total de muertes a nivel mundial, de los cuales 608, 000 decesos fueron ocasionados por cáncer de colon.⁸ En México, el cáncer de colon provoca nueve muertes diarias y 58 diagnósticos nuevos, ubicándolo como una de las enfermedades más agresivas.^{9, 10} La Asociación Americana del Cáncer estima que 70% de los enfermos con cáncer tienen problemas asociados a algunas deficiencias de nutrimentos.¹¹

En la actualidad, existe un gran interés por la industria farmacéutica en encaminar esfuerzos a la búsqueda de alternativas profilácticas.^{3, 12, 13} De ahí surge en 1989 el término farmacológico nutracéutico para denominar a los compuestos químicos de origen natural con propiedades biológicas activas, que brinden beneficios para la salud con capacidad preventiva y/o terapéutica.¹⁴ Los nutracéuticos han evolucionado la ciencia entre los alimentos y la nutrición y se han involucrado en el tratamiento de ciertas enfermedades y la reducción del riesgo de muerte.¹¹ El uso de prebióticos, probióticos, simbióticos y antioxidantes, entre otros, aparecen como una nueva herramienta para el tratamiento de enfermedades.

1.1 Microbiota Intestinal

La microbiota intestinal juega un papel primordial en el desarrollo o prevención de enfermedades gastrointestinales y está compuesta por más de 400 especies diferentes de microorganismos. Además, la composición bacteriana es diferente tanto cualitativa como cuantitativamente en los distintos segmentos del tracto gastrointestinal. En la Figura 1.1 (pp. 3) se muestra la distribución y la composición de las diferentes especies bacterianas.

En el estómago y el duodeno el pH es bastante ácido, la concentración bacteriana llega hasta 10^3 unidad formadora de colonias (UFC) /mL; en el yeyuno e íleon disminuye la acidez debido a la dilución de los ácidos y a la presencia de sales biliares, lo que facilita la colonización bacteriana, en esta parte habitan en promedio de 10^4 a 10^8 UFC/mL, mientras que en el colon se encuentra la mayor cantidad de microorganismos, que va desde 10^9 hasta 10^{12} UFC/mL dando lugar a que más de la tercera parte del contenido en materia seca de las heces sean bacterias.^{12, 14, 15}

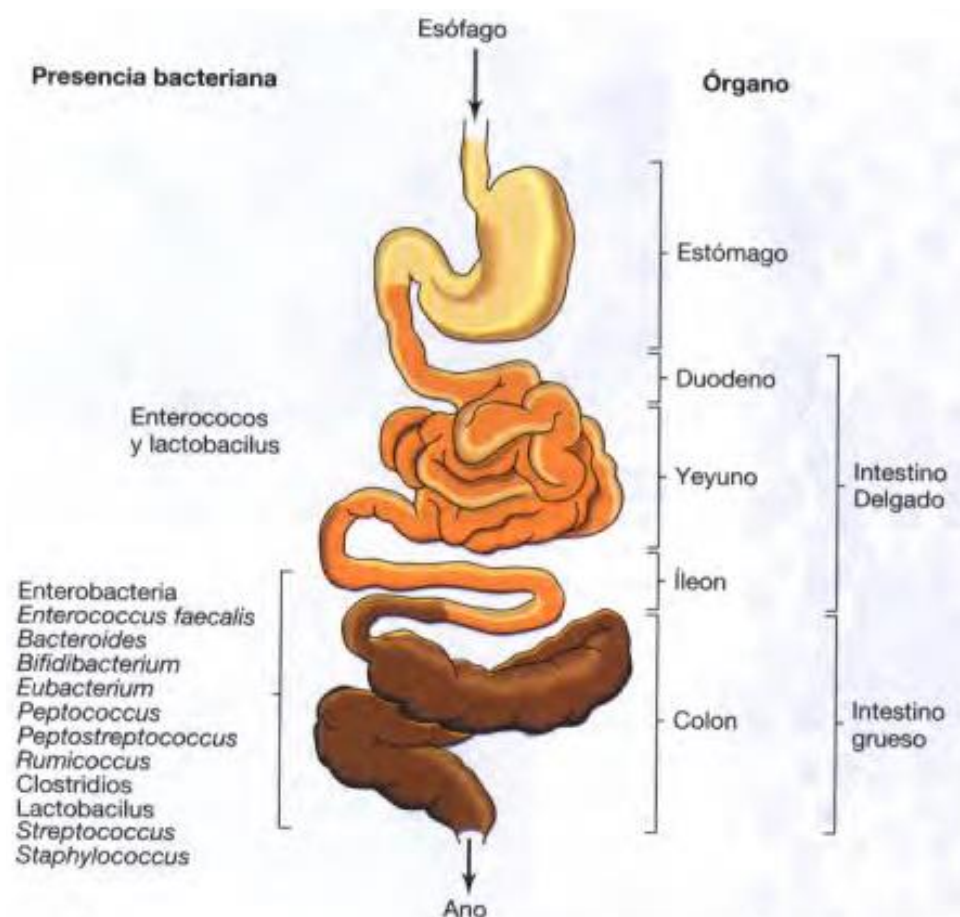


Figura 1.1 Distribución y composición de las diferentes especies bacterianas en el tracto gastrointestinal.¹⁴

De todas estas especies bacterianas unas son benéficas y otras patógenas, por lo que la actividad metabólica de las mismas puede tener un efecto positivo o negativo en la salud, mantener un balance adecuado en el ecosistema intestinal siempre a favor de las bacterias beneficiosas es fundamental para el organismo.¹⁶ En la Figura 1.2 (pp. 5) se muestra una visión simplificada de la microbiota del colon, los grupos bacterianos situados a la izquierda de la barra tienen efectos predominantemente perjudiciales sobre la salud humana, mientras que los de la derecha ejercen efectos beneficiosos. Algunos grupos están a ambos lados de la barra, éstos contienen especies tanto beneficiosas como perjudiciales.^{17, 18}

Dentro de las bacterias indeseables se encuentran, entre otras, especies de los géneros *Clostridium* y *Veillonella*. Estos géneros originan sustancias potencialmente perjudiciales tales como productos putrefactivos, toxinas y carcinógenos que pueden causar diarrea, infecciones, daño en el hígado, carcinogénesis y putrefacción intestinal.^{17, 18}

Las bacterias beneficiosas incluyen principalmente especies del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que le confieren al hospedero beneficios nutricionales (producción de ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos y vitaminas, y promoción de la absorción de iones), de protección y prevención de enfermedades (barrera que impide la invasión de patógenos) e importantes efectos sobre el epitelio intestinal y la modulación del sistema inmunológico.^{17, 18}

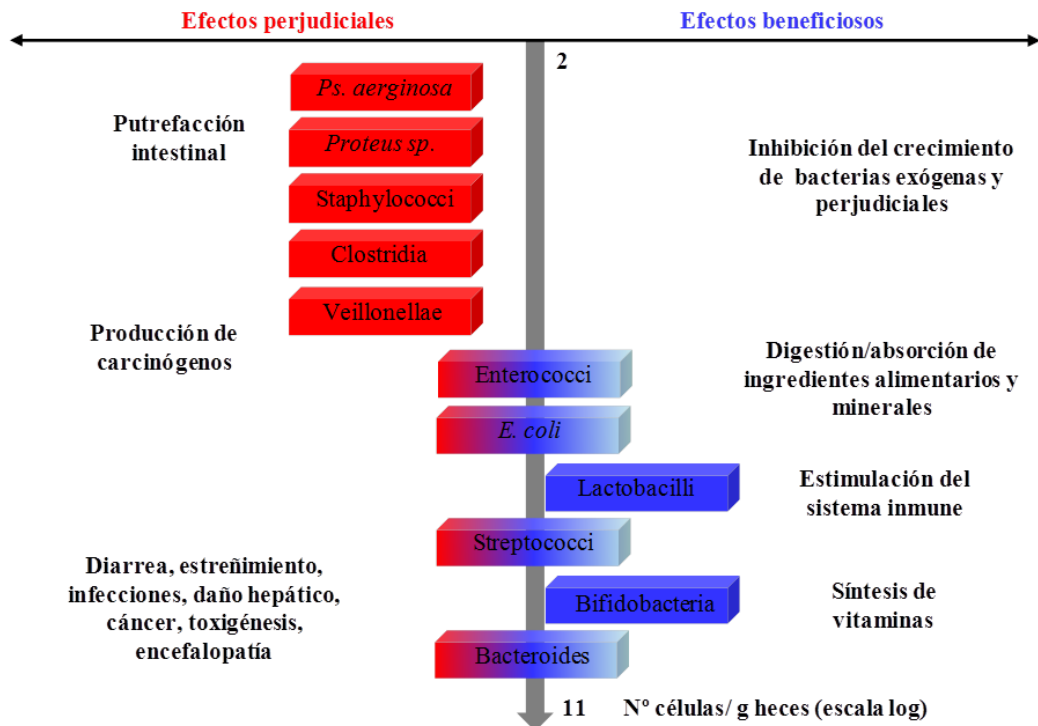


Figura 1.2. Visión simplificada de la microbiota del colon.¹⁷

El crecimiento de estas bacterias está relacionado con su capacidad de producir carbohidrasas, así como transportadores de mono y oligosacáridos implicados en el metabolismo de carbohidratos extradigestivos.¹⁵

El equilibrio del organismo se ve afectado cuando se rompe la relación del hospedero con su microbiota benéfica, como cuando se usan antibióticos o ante una infección gastrointestinal.¹² En ausencia de microbiota normal, las condiciones microambientales del intestino grueso cambian y pueden establecerse microorganismos oportunistas como *Staphylococcus*, *Proteus*, o la levadura *Candida albicans* produciendo cambios patológicos importantes que se relacionan con procesos inflamatorios, autoinmunes e infecciosos, entre otros.¹⁴ Debido a lo anterior, es importante conservar la homeostasis intestinal, a través del balance microbiano. Una alternativa es a través del uso de oligosacáridos prebióticos.^{12, 14}

1.2 Prebióticos

Los prebióticos son compuestos no digeribles que benefician la salud del ser humano, asociados a una modulación de la microbiota intestinal, estimulando de manera selectiva el crecimiento y/o actividad bacteriana autóctona benéfica del sistema digestivo.^{12, 19, 20} El efecto prebiótico se evalúa con base en el incremento de las bacterias benéficas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, la disminución de clostridios y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).¹²

Para que un compuesto sea considerado prebiótico tiene que cumplir con los siguientes criterios.¹⁷

1. Resistencia a la acidez gástrica.
2. Resistencia a la hidrólisis por las enzimas gastrointestinales.
3. Que no sea absorbido en el intestino delgado.
4. Que sea fermentado por las bacterias intestinales.
5. Que induzca la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad bacteriana intestinal asociada con la promoción de la salud y el bienestar del hospedero.

La actividad prebiótica promueve algunas funciones fisiológicas dentro de las cuales se encuentran: disminución de infecciones intestinales,³ biodisponibilidad de minerales como calcio y magnesio,²¹ disminución de problemas de constipación,²⁰ disminución de los niveles de colesterol,^{22, 23} reducción del riesgo de cáncer de colon²⁴, disminución de problemas de hipertensión,^{22,23} estimulación del sistema inmunológico²⁰ y reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.^{22, 23} En la Figura 1.3 (pp. 7) se muestra un esquema del mecanismo propuesto de los efectos a la salud tras la ingesta de prebióticos.²⁵

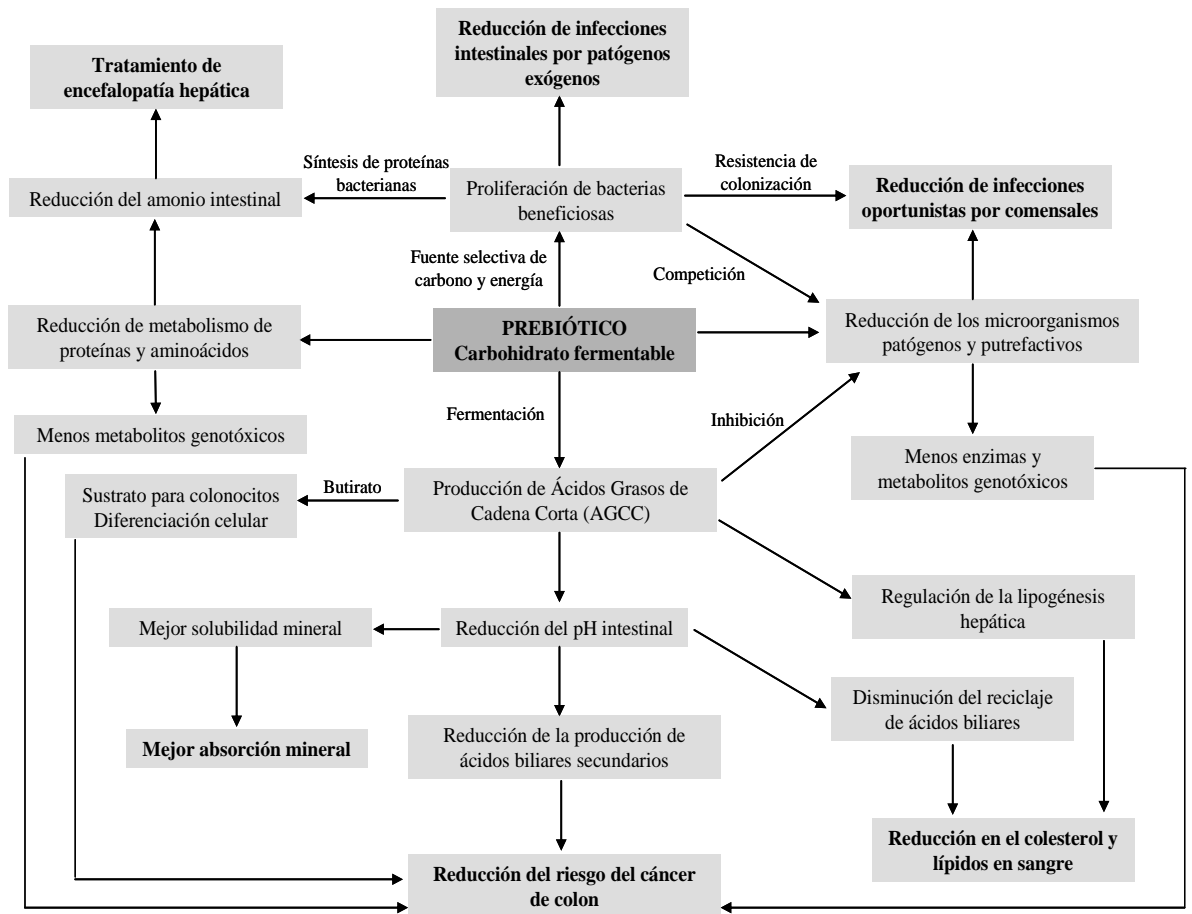


Figura 1.3 Mecanismos propuestos para la promoción de la salud en humanos como resultado de la ingestión de prebióticos.²⁵

1.2.1 Mecanismo de Acción

Los prebióticos son compuestos no digeribles por lo que pueden alcanzar la parte distal del intestino grueso para ser hidrolizados por bacterias que sintetizan enzimas extracelulares como fructofuranosidasas, galactosidasas, xilanasas y otras carbohidrasas.¹² De esta manera se genera un incremento en la fermentación de carbohidratos y una disminución en la degradación y fermentación de proteínas.

La fermentación de carbohidratos resulta en la generación de productos inofensivos o hasta benéficos, mientras que la degradación de proteínas y aminoácidos tiene como resultado la producción de compuestos potencialmente dañinos como aminas, amonio y compuestos fenólicos, considerados perjudiciales para el tracto gastrointestinal.²⁶ Un esquema de los productos de la digestión de polisacáridos y proteínas se muestra en la Figura 1.4.

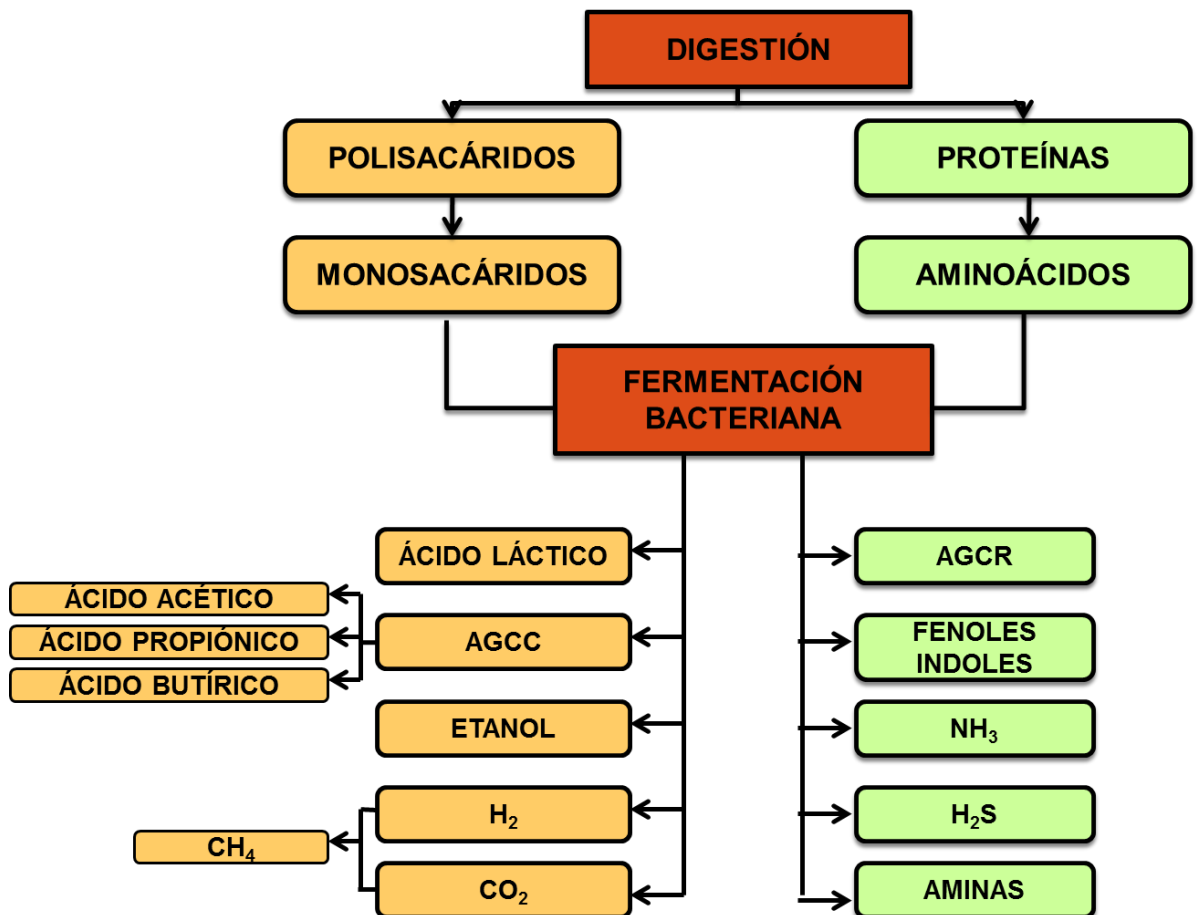


Figura 1.4. Esquema de la fermentación de proteínas y carbohidratos por la microflora intestinal. AGCC = Ácidos Grasos de Cadena Corta, AGCR = Ácidos Grasos de Cadena Ramificada

El metabolismo continúa en el interior de la bacteria hasta la obtención de piruvato a través de la vía metabólica de Embden-Meyerhoff-Parnas (vía glucolítica) o Warburg-Dickens (vía de las pentosas fosfato).^{27, 28} En la Figura 1.5 se muestra un esquema de las vías metabólicas microbianas dependiendo del tipo de sustrato.

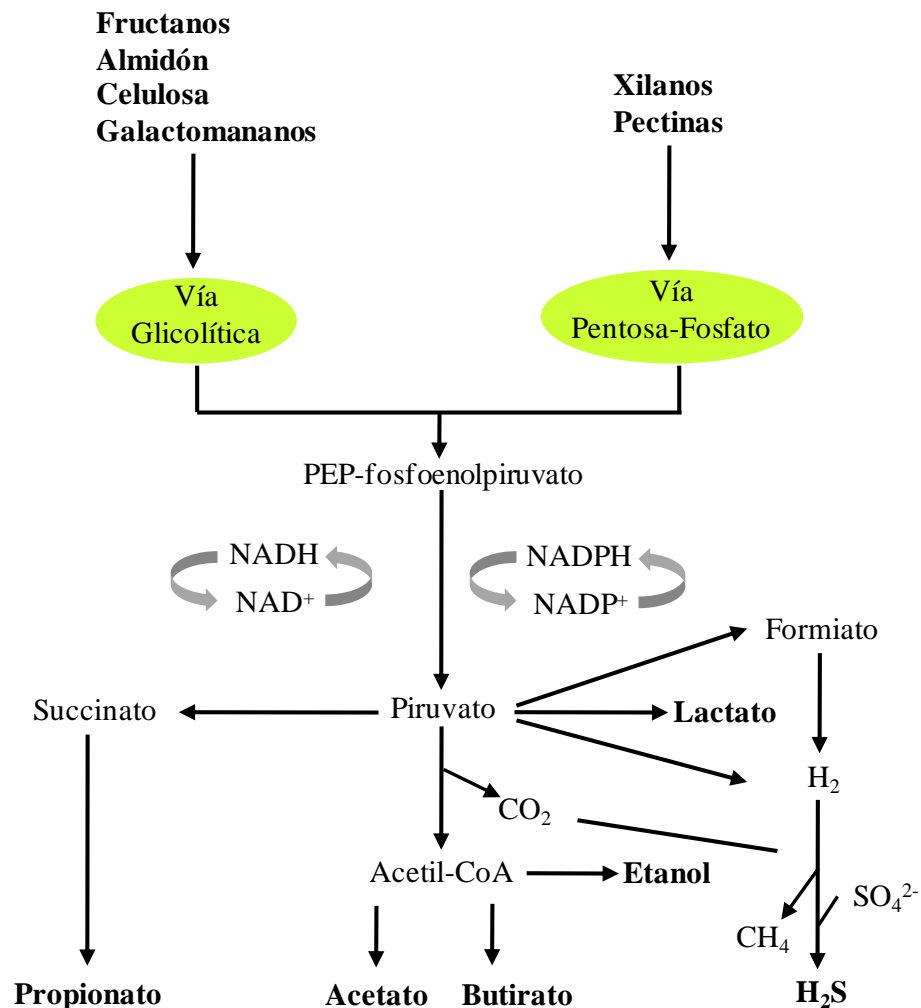


Figura 1.5. Principales vías de producción de los AGCC y otros metabolitos por fermentación bacteriana en el lumen del colon.²⁷

El piruvato posteriormente es convertido en AGCC como ácido acético, ácido propiónico o ácido butírico y también puede ser transformado a productos gaseosos finales como CO_2 , H_2 y CH_4 .²⁰ Los productos generados en la fermentación del piruvato producen efectos positivos en el metabolismo del huésped. Los gases formados son utilizados por otros microorganismos presentes en la microflora intestinal como bacterias metanogénicas y acetogénicas.²⁹

Los AGCC formados disminuyen el pH del ambiente por lo que facilitan el crecimiento de otras bacterias benéficas para el colon. Tanto el pH como la generación de gases ocasionan la formación de un consorcio bacteriano benéfico que impide el crecimiento de bacterias patógenas. Además, el aumento en la masa celular bacteriana incrementa el movimiento peristáltico facilitando la evacuación intestinal.¹² La disminución del pH por los AGCC tiene como consecuencia además el incremento en la solubilización de minerales y por lo tanto en su absorción.²¹ Sin embargo, la disminución del pH no es la única función de los AGCC, estos son absorbidos en el colon y metabolizados en diferentes tejidos: el ácido butírico por el tejido colónico, el ácido propiónico y el ácido acético por el hígado y el ácido acético también puede ser metabolizado en el músculo y otros tejidos periféricos. El ácido acético y el ácido propiónico contribuyen a la disminución de problemas asociados con el metabolismo de lípidos, inhibe la síntesis de ácidos grasos en el hígado reduciendo los niveles de colesterol.^{22, 23} El ácido butírico, utilizado por los colonocitos, es metabolizado hasta CO_2 y cuerpos cetónicos por lo que se disminuye el metabolismo de proteínas y lípidos que generan productos tóxicos. Por otra parte, el ácido butírico actúa como regulador del crecimiento celular, ya que retarda la proliferación celular y favorece la diferenciación y la apoptosis. A este mecanismo se atribuye la reducción del riesgo de cáncer de colon.²⁴

Finalmente, el metano y el H₂ son liberados por la respiración y los flatos. La producción de gases, especialmente si es rápida, es una de las principales desventajas cuando se ingieren alimentos con un elevado contenido de sustratos fermentables.²⁰

1.2.2 Prebióticos Comerciales

Dentro de los compuestos prebióticos se encuentran los oligosacáridos no digeribles (OND).^{12,30,32} Algunos de ellos están bien establecidos como prebióticos a nivel mundial y desde el punto de vista comercial los oligosacáridos más importantes son la inulina, los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos; sin embargo, existe una serie de OND que se consideran prebióticos emergentes. En la Tabla I (pp. 12) se mencionan OND pero aún no se ha demostrado la capacidad prebiótica de todos los compuestos listados por la falta de estudios concluyentes.^{30, 31, 32, 33}

TABLA I

NOMBRE Y ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS³²

Nombre	Nombre comercial	Estructura química y tipo de enlace glucosídico
Inulina	Raftiline®	α -D-Glu-(1,2)-[β -D-Fru] _n -(1,2)- β -D-Fru (n=10-60)
Oligofructosa	Raftilose®	β -D-Fru-(1,2)-[β -D-Fru] _n -(1,2)- β -D-Fru (n=2-10)
Fructooligosacáridos	Actilight®	α -D-Glu-(1,2)-[β -D-Fru] _n -(1,2)- β -D-Fru (n=1-3)
Galactooligosacáridos	Oligomate®	α -D-Gal-(1,6)-[β -D-Gal] _n -(1,4)- β -D-Glu (n=1-5)
Galactotriosa/TOS	Cup-Oligo®	α -D-Gal-(1,6)-[β -D-Gal] _n (n=2)
Isomaltooligosacáridos	Isomalto-900®	[α -D-Glu-(1,6)] _n (n=2-5)
Sojaoligosacáridos	Soya-Oligo®	[α -D-Gal-(1,6)] _n - α -D-Glu-(1,2)- β -D-Fru (n=1-3)
Xilooligosacáridos	-	[β -D-Xi-(1,4)] _n (n=2-9)
Gentiooligosacáridos	Gentose®	[β -D-Glu-(1,6)] _n (n=2-5)
Lactulosa	Duphalac®	β -D-Gal-(1,4)- β -D-Fru
Lactosucrosa	-	β -D-Gal-(1,4)- α -D-Glu-(1,2)- β -D-Fru
Celobiosa	-	β -D-Glu-(1,4)-D-Glu
Celodextrinas		[β -D-Glu-(1,4)] _n -D-Glu (n=3-6)
Ciclodextrinas	Dexy Pearl®	[α -D-Glu-(1,4)] _n cíclico (n=6-12)
Glucanooligosacáridos	-	-
Leucrosa	-	α -D-Glu-(1,5)-D-Fru
Maltitol		α -D-Glu-(1,6)-D-Sor
Palatinosaoligosacáridos	-	[α -D-Glu-(1,6)-D-Fru] _n (n=2-4)
Lactitol	-	β -D-Gal-(1,4)-D-Sor
Maltooligosacáridos	-	[α -D-Glu-(1,4)] _n (n=2-7)
Manooligosacáridos	Alltech®	[α -D-Man-(1,6)] _n (n=2-8)
Glucosilsucrosa	Coupling Sugar®	α -D-Glu-(1,4)- α -D-Glu-(1,2)- β -D-Fru

Fru=Fructosa, Gal=Galactosa, Glu=Glucosa, Man=Manosa, Sor=Sorbitol, Xil=Xilosa

1.2.3 Métodos para Determinar el Carácter Prebiótico

Entre los criterios mencionados con anterioridad que debe cumplir un compuesto para ser considerado prebiótico, el que concierne a la estimulación selectiva de las bacterias beneficiosas es el más difícil de demostrar y de cumplir. Por lo cual, a medida que el campo de los prebióticos se ha ido desarrollando, la metodología para determinar su funcionalidad, especialmente relacionada con los cambios en la microbiota gastrointestinal, también se ha ido modificando y perfeccionando.³⁴

Los métodos para determinar el carácter prebiótico son:

1.2.3.1 Cultivos puros.

Los cultivos puros son la vía más sencilla y la primera en ser utilizada en los estudios con prebióticos. El sustrato se añade a un medio basal donde tiene lugar el crecimiento bacteriano durante un tiempo de incubación determinado.³⁵ Este tipo de estudio proporciona una idea de cómo tiene lugar la fermentación del sustrato a evaluar, pero no tiene en cuenta la posible interacción entre bacterias.

1.2.3.2 Cultivos mixtos.

Dentro de los estudios llevados a cabo con cultivos mixtos, el más sencillo es aquel en el que se utiliza un determinado número de especies seleccionadas (beneficiosas y perjudiciales) del tracto gastrointestinal. De esta manera se introduce en el sistema un cierto grado de competición entre los microorganismos. Este modelo de fermentación es útil para predecir cómo influye el sustrato a estudiar en las especies consideradas patógenas.³⁶

1.2.3.3 Inóculos fecales.

El uso de inóculos fecales es un método más fiable que asegura que un número representativo de especies bacterianas se exponga al carbohidrato a ensayar.³⁶ Sin embargo, en estudios en sistemas en discontinuo la cantidad de sustrato es limitada y sólo es útil para experimentos con un tiempo de duración pequeño, hay que tener en cuenta que en el ser humano, el colon se está llenando constantemente de nutrientes.³⁵

1.2.3.4 Fermentadores en continuo.

Un buen modelo gastrointestinal debería ser capaz de reflejar las diferentes regiones del colon, para lo cual se han empleado fermentadores en continuo para simular el tracto intestinal desde el yeyuno hasta el colon descendente.³⁷ Los experimentos que se desarrollan generalmente con cultivos continuos tienen la limitante de que los metabolitos no son absorbidos o drenados de los fermentadores como sucede naturalmente en el colon por lo que la acumulación de estos productos afecta el equilibrio de los procesos bioquímicos (inhibición). Aun así, este tipo de estudios son considerados de gran importancia.³⁸

1.2.3.5 Estudios moleculares del potencial prebiótico.

El estudio del potencial prebiótico de los oligosacáridos se ha llevado a cabo mediante técnicas tradicionales de recuento en cultivos. El crecimiento de estas bacterias refleja su abundancia relativa, pero hay que tener en cuenta que no todas las bacterias son cultivables, lo cual supone una limitación de los métodos de medida tradicionales. Por ello, para llevar a cabo la identificación de las diferentes poblaciones bacterianas se han utilizado métodos basados en técnicas moleculares que proporcionen mayor información y fiabilidad.³⁴

La Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (Polymerase Chain Reaction, q-PCR) y la Hibridación Fluorescente *in situ* (Fluorescence *in situ* Hybridation, FISH), son las más empleadas por ser herramientas eficientes para conocer la compleja composición de la microbiota gastrointestinal.³⁴

1.2.3.5.1 Hibridación Fluorescente *in situ*. La técnica de FISH permite no sólo conocer la filogenia de las bacterias sino también su morfología, localización y abundancia. Esto se logra gracias a la utilización de sondas de ácidos nucleicos marcadas con un tinte fluorescente cuyas dianas son regiones específicas de las moléculas de ARNr 16S de las bacterias. La especie, el género, la familia y el dominio pueden ser determinados utilizando una sonda específica. La utilización de estas sondas y las condiciones de tratamiento adecuadas permiten detectar específicamente los microorganismos fijados de manera adecuada, ya sea por la manera más tradicional mediante microscopía de fluorescencia o microscopía confocal de barrido láser o por métodos de recuento semiautomáticos.^{14, 39, 40}

1.3 Antioxidantes

El estrés oxidativo es el resultado de la alteración en los mecanismos antioxidantes de defensa por la excesiva acumulación de radicales libres; éste a su vez aumenta la formación de aniones superóxido, radicales hidroxilo, oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno, radicales de óxido nítrico y de hipoclorito que son todos capaces de reaccionar con los lípidos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas y enzimas provocando daño celular.^{11, 41} El daño celular causado por los radicales libres parece contribuir al envejecimiento y las enfermedades degenerativas tales como: cáncer, aterosclerosis, artritis, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, cataratas, deficiencia inmune, enfermedades del hígado, inflamación, insuficiencia renal y disfunción cerebral.^{41, 42}

Los antioxidantes son moléculas que neutralizan los radicales libres, y son capaces de retardar y prevenir el envejecimiento, la degeneración y muerte de las células. Entre los antioxidantes más importantes se puede mencionar al ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenos y compuestos fenólicos como las isoflavonas, flavonoides y antocianinas, entre otros.^{11, 41, 42, 43}

Los antioxidantes pueden actuar por diferentes mecanismos y por cooperación de los mismos, por tal razón, para determinar la actividad antioxidante de un compuesto es aconsejable utilizar diferentes ensayos. Dentro de los mecanismos de acción se encuentran por transferencia de electrones, por neutralización de radicales libres o por ambas.^{41, 43}

1.3.1 Ácido Ferúlico

El ácido ferúlico (AF) (ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenóico) es uno de los ácidos fenólicos más abundantes encontrados en la naturaleza, es derivado del ácido cinámico, éste puede ser encontrado de manera libre o conjugada mediante enlaces tipo éster unido a polisacáridos, tales como arabinosilanos, hemicelulosa y celulosa, formando parte de las paredes celulares de plantas y granos.^{42, 44, 45}

El AF es el principal compuesto fenólico presente en el maíz (*Zea mays*), y se concentra en el pericarpio del grano en forma libre o esterificado a los heterosilanos que constituyen la hemicelulosa de la pared celular. El maíz contiene más fenoles totales y mayor poder antioxidante que cereales como trigo, arroz y avena.^{42, 44}

La actividad antioxidante del AF (Figura 1.6, pp. 17) está relacionada con su anillo fenólico que, en conjunto con doble enlace que extiende la conjugación presente entre el extremo carboxílico y el anillo, son capaces de formar un radical libre estabilizado por resonancia. De esta manera, actúa como una molécula protectora reaccionando con las especies reactivas del oxígeno evitando que éstas reaccionen con moléculas del organismo.^{44, 46, 47}

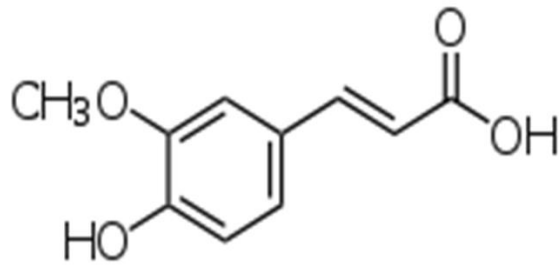


Figura 1.6 Estructura química del ácido ferúlico.

1.4 Oligosacáridos no Digeribles

La inulina, los galactooligosacáridos, los FOS y la lactulosa son OND que poseen evidencia suficiente en estudios *in vitro* e *in vivo* para ser clasificados como prebióticos. Sin embargo, existen otros compuestos como los xilooligosacáridos (XOS) y arabinoxilooligosacáridos (AXOS), que son denominados prebióticos emergentes porque poseen un potencial prebiótico promisorio.^{13, 20, 48} Los XOS y AXOS presentan la cualidad de poder ser obtenidos a partir de material lignocelulósico (MLC) de bajo costo, rico en hemicelulosa que normalmente es desechado por la industria agroalimentaria.

1.4.1 Materiales Lignocelulósicos

Los MLC se refieren a los distintos tipos de biomasa vegetal que están formados mayoritariamente por polisacáridos (celulosa y hemicelulosas) y por lignina (un polímero de naturaleza fenólica). Estos son una de las materias primas de mayor interés que existen en el mundo, debido a su composición y propiedades, además de su carácter renovable, su abundancia y su bajo costo.⁴⁹

Los MLC presentan una composición variable y condicionada por diversos factores como: origen del material, localización geográfica, condiciones de crecimiento, etc.^{50,51,52} Los componentes de los MLC se dividen en componentes estructurales y no estructurales.⁵³ Los componentes estructurales de los MLC (celulosa, hemicelulosa y lignina) le confieren firmeza y protección a la célula, estos se encuentran interpenetrados y unidos mediante interacciones químicas y físicas. En la Figura 1.7 se muestra una imagen representativa.^{53, 54, 55} Los componentes no estructurales comunes en los MLC son: agua, cenizas (constituidas por sales inorgánicas), extractos (corresponden a fluidos biológicos de las plantas y se caracterizan por ser fácilmente separables por la acción de vapor o de disolventes orgánicos sin necesidad de que exista reacción química), proteínas y almidón.^{53, 56}

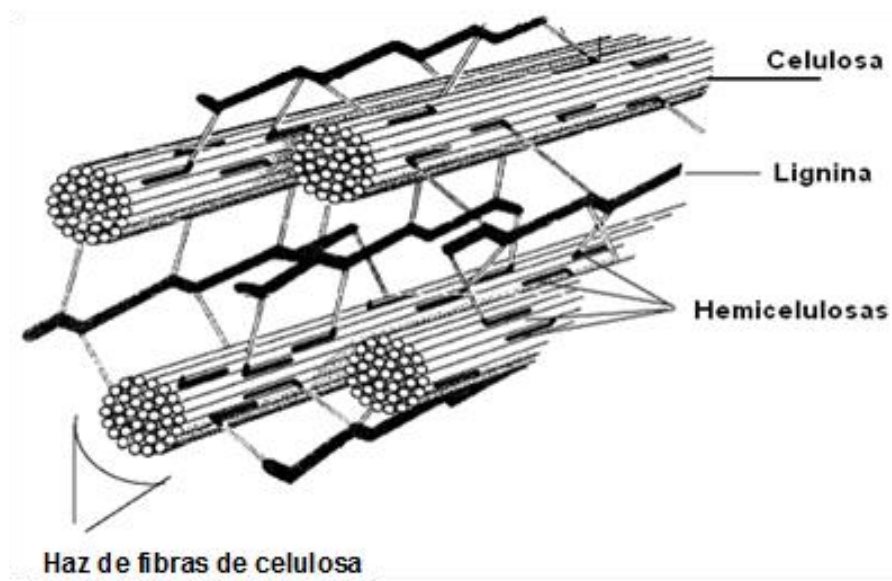


Figura 1.7. Disposición tridimensional de los componentes estructurales dentro de la pared de la célula vegetal.⁵³

1.4.1.1 Celulosa.

Es un polisacárido lineal formado por unidades de glucosa unidas por enlaces β -(1,4) y es el componente más abundante de las paredes celulares de plantas superiores.⁵⁷

1.4.1.2 Hemicelulosa.

El término hemicelulosa engloba a todos los polisacáridos estructurales que se encuentran en los MLC excepto la celulosa.⁵⁸ La función de las hemicelulosas en los vegetales es facilitar las uniones químicas entre la celulosa y la lignina, actuando como puente de unión entre ellas.⁵³

Las hemicelulosas, a diferencia de la celulosa, están compuestas por diferentes azúcares formando cadenas más cortas y con ramificaciones. Entre los azúcares que forman las hemicelulosas se puede encontrar pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (glucosa, manosa, galactosa) y derivados de monosacáridos como ácidos urónicos (ácidos glucurónico y galacturónico) y desoxihexosas (ramnosa y fucosa).⁵⁹

La fracción hemicelulósica es la que presenta diferencias más significativas entre los diversos MLC.⁶⁰ La cadena principal de una macromolécula hemicelulósica puede estar constituida por un solo monómero, homopolímero (xilanos, mananos o galactanos) o por dos o más unidades monoméricas distintas, heteropolímero (glucomanos, arabinogalactanos o arabinoxilanos).⁶¹

1.4.1.3 Lignina.

La lignina es un polímero aromático hidrófobo heterogéneo con estructura tridimensional y amorfa formada a partir de unidades estructurales de 4-fenilpropano (alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico) y grupos metoxilo. Es fuertemente resistente a la hidrólisis ácida (debido al enlace covalente carbono-carbono) y con índices de polimerización variables.^{53, 62} Las funciones biológicas de la lignina incluyen actuar como aglomerante de las fibras de celulosa (dándoles mayor rigidez mecánica) y proteger a la célula y a la planta de ataques externos (tanto ambientales como microbiológicos).⁶²

1.4.2 Arabinoxilano

Los xilanos son los principales componentes de las hemicelulosas y se pueden dividir en tres grupos: glucuronoarabinoxilanos (maderas suaves), glucuronoxilanos (maderas duras) y arabinoxilanos (residuos agrícolas).⁶⁰

En los residuos agrícolas, la hemicelulosa es un grupo de heteropolisacáridos ramificados del tipo arabinoxilano (AX), también llamado pentosano,⁶³ este es uno de los principales polisacáridos estructurales presentes en la pared de los granos de cereales, constituyen alrededor del 20-30% del peso seco de residuos agrícolas, tales como paja de cereales y cáscara de granos.⁶⁴ Las paredes celulares de las cáscaras de los cereales como maíz, trigo, arroz y cebada contienen componentes fenólicos, como el ácido ferúlico, *p*-cumárico y sinápico, que representan el 1-2% del peso seco del material, encontrándose esterificados en las hemicelulosas y presentando propiedades antioxidantes.^{65, 66}

1.4.2.1 Estructura del Arabinoxilano.

El AX (Figura 1.8, pp. 21) tiene un esqueleto principal formado por unidades de xilosa unidas por enlaces β -(1,4) y puede tener sustituyentes en las posiciones 2 y 3 como arabinosa, glucosa, galactosa, ácido glucurónico, ácido ferúlico, ácido acético, entre otros.^{67, 68} La frecuencia y composición de las ramificaciones dependen de la fuente de xilano.⁷⁰ En su mayoría los ácidos ferúlico y *p*-cumárico se encuentran unidos a unidades de arabinosa esterificados en el carbono C-5.⁷⁰ La distribución de las unidades de arabinosa a lo largo de la cadena principal son de suma importancia, debido a que influye en la conformación del polímero y en su capacidad para interactuar con otros polisacáridos.⁶³

La hidrólisis bajo condiciones controladas del AX genera carbohidratos de bajo grado de polimerización (GP) como XOS y AXOS.⁶⁸

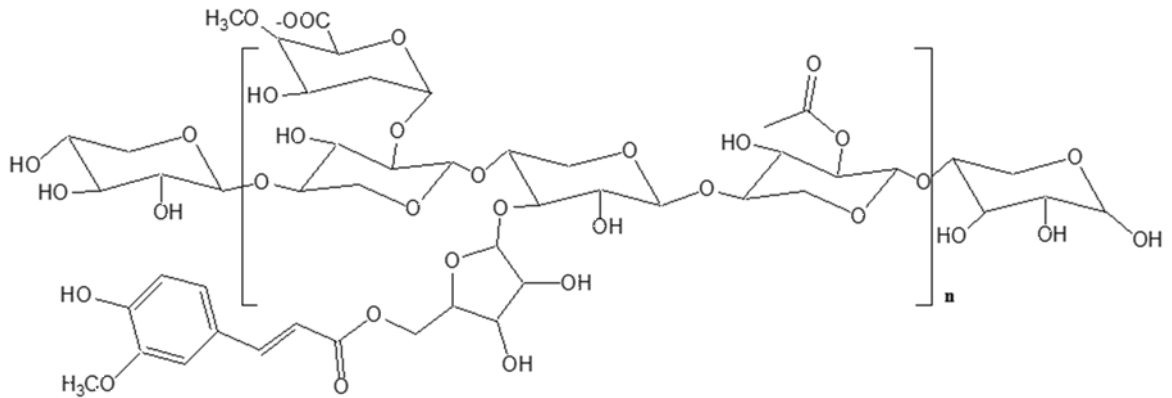


Figura 1.8 Estructura del arabinoxilano.

1.5 Métodos de Obtención de Oligosacáridos

1.5.1 Residuos Agroindustriales

Los residuos generados por la industria agrícola, ganadera y pesquera son denominados agroindustriales. La producción de XOS y AXOS, a partir de residuos agroindustriales, se ha realizado a través de métodos químicos y biológicos utilizados de forma alternativa o secuencial, el número de pasos a utilizar depende de la composición del sustrato vegetal.^{71, 72}

Se han reportado estudios utilizando madera,⁷³ residuos de cosechas,⁶⁸ tallo de algodón,⁷⁴ paja y salvado de trigo,^{68, 75} cáscara de arroz,^{76, 77} bagazo de caña de azúcar,⁶⁸ tallos y mazorca de maíz,^{68, 78, 79} cáscara de maní,⁷⁵ cáscara de almendra,⁷³ paja de cebada,^{73, 80} huesos de aceituna,¹⁴ entre otros.

1.5.2 Métodos Químicos

Los métodos químicos implican la utilización de ácidos, álcalis o vapor.⁸¹

1.5.2.1 Métodos con Ácidos o Bases.

Los métodos ácidos (prehidrólisis ácida) utilizan disoluciones ácidas concentradas o diluidas, generalmente de ácidos fuertes como H_2SO_4 y HCl a bajas temperaturas.⁸² Cruz y col. (2000) sometieron mazorcas de maíz a tratamientos con H_2SO_4 al 2% a 125 °C durante 15 minutos solubilizando el 98% del xilano inicial.⁸⁴ Así mismo, se han obtenido altos rendimientos de solubilización del xilano (cerca del 92%) en las mismas condiciones a partir del residuo sólido procedente del malteado en la producción de cerveza (Mussatto y Roberto, 2005).⁸⁵

La hidrólisis ácida diluida se utiliza también como tratamiento previo del MLC antes de la hidrólisis enzimática. En los tratamientos alcalinos, las hemicelulosas se disuelven en soluciones de $NaOH$, KOH , $Ca(OH)_2$, $Ba(OH)_2$, etc.⁸³

1.5.2.2 Autohidrólisis.

Este método consiste en someter a la hemicelulosa a condiciones controladas de presión y temperatura ocasionando la desacetilación del xilano. El ácido acético liberado genera condiciones ácidas que favorecen la solubilización e hidrólisis de la hemicelulosa.^{78, 79, 86} La autohidrólisis no implica el uso de productos químicos y permite realizar el proceso de hidrólisis lo suficientemente suave como para provocar una despolimerización selectiva de la hemicelulosa sin degradación substancial de las fracciones de celulosa y lignina.^{86, 87}

La solubilización de la hemicelulosa puede lograrse mediante tratamientos hidrotérmicos por presentar mayoritariamente estructuras amorfas, requiriendo tratamientos menos severos que la celulosa.⁸⁸ La hemicelulosa sufre reacciones de hidrólisis a temperaturas comprendidas entre 150 y 230 °C y la fracción celulósica lo hace a temperaturas superiores (230-280 °C).^{89, 90} En el 2005, Vegas y col. reportaron un proceso a partir de residuos de la industria cervecera en un reactor discontinuo de acero inoxidable (reactor Parr) a 207 °C obteniendo un rendimiento de 70%⁹¹, similar a lo reportado por Carvalheiro en el 2004 utilizando una temperatura de 190 °C y 5 minutos de reacción.⁸⁰

Las condiciones de operación de los tratamientos hidrotérmicos se pueden optimizar para producir la hidrólisis total o parcial de la hemicelulosa y en este último caso, para maximizar la producción de oligosacáridos.^{86, 92} Dependiendo de las condiciones de operación y del material a hidrolizar, los xilanos se despolimerizan a XOS de alto peso molecular. En reacciones consecutivas se generan XOS de bajo peso molecular, xilosa, furanos, ácidos carboxílicos y componentes fenólicos.⁹³ Moura y col. (2007) reportaron la obtención de XOS a través de la autohidrólisis de mazorcas de maíz. El rendimiento máximo de XOS obtenido fue de 65%. Estos presentaban GP de 2-6, además de monómeros de azúcares, ácido acético y furfural.⁷⁸

El furfural y el 5-hidroximetilfurfural (HMF) son los furanos más importantes, formados por descomposición de pentosas y hexosas, respectivamente.^{94, 95, 96} La formación de diferentes tipos de ácidos carboxílicos (como ácido levulínico y ácido fórmico) tiene lugar a partir de los furanos.⁹⁶ Garrote y col. (2001) también emplearon la autohidrólisis con residuos de maíz logrando solubilizar el 75.7% del xilano inicial en forma de oligosacáridos y xilosa. Además se formó furfural en una concentración correspondiente al 2% del xilano inicial.⁹⁷ Una severidad moderada en la autohidrólisis reduce las concentraciones de productos de degradación procedentes de los sacáridos (Carvalheiro y col. 2005).⁹²

En comparación con otros procesos de aprovechamiento de la fracción hemicelulósica, la autohidrólisis permite obtener altos rendimientos, es un proceso respetuoso con el medio ambiente y no hidroliza los compuestos antioxidantes fenólicos esterificados.^{78,87 81} En el 2010, Rose e Inglett reportaron el uso de un método autohidrolítico mediante la utilización de microondas para la obtención de feruloil-AXOS. Este método generó feruloil-AXOS y una baja proporción de subproductos cuando se aplica un tratamiento térmico al maíz antes de someterlo a la irradiación de las microondas. El rendimiento máximo fue de 50% del xilano original, obtenido con el tratamiento a 180 °C por 10 min o 200 °C por 2 min. El rendimiento del método autohidrolítico por microondas es bajo en comparación con el obtenido en reactores Parr; sin embargo, los feruloil-AXOS obtenidos poseen alrededor del 60% del ácido ferúlico inicial.⁷⁹

1.5.3 Métodos biológicos

Los métodos biológicos implican el uso de microorganismos y/o sus enzimas.⁸¹ La hidrólisis enzimática se puede llevar a cabo mediante la utilización de biocatalizadores comerciales o microorganismos que actúen directamente sobre el MLC ya sea en una fermentación en estado sólido o fermentación sumergida.^{106, 107}

1.5.3.1 Tratamientos con Enzimas.

En la hidrólisis enzimática, donde la catálisis es mucho más específica, hay que tener en cuenta la estructura de la fracción hemicelulósica a separar debido a que la degradación de polisacáridos requiere la interacción sinérgica o cooperativa de diferentes enzimas para romper enlaces de distinta naturaleza.⁹⁸

1.5.3.1.1 Enzimas que Degradan el Arabinoxilano. La cadena principal de AX es degradada por glucósido hidrolasas (GH) que son capaces de hidrolizar los enlaces xilosídicos presentes en el AX, glucuronoxilano y arabinoglucuronoxilano.⁹⁹

Las enzimas más importantes para despolimerizar la cadena principal del xilano, son las endo-(1,4)- β -xilanasas que originan oligosacáridos de xilosa y las β -(1,4)-xilosidasas que convierten a éstos en moléculas de xilosa, por lo que la presencia de estas enzimas en las preparaciones utilizadas en la generación de XOS debe ser mínima.⁹⁹ Con base en su conformación estructural, las xilanasas pueden agruparse en dos familias: familia GH-10, con peso molecular relativamente alto, y familia GH-11, con peso molecular bajo.¹⁰⁰ Las enzimas de la familia GH-10 y GH-11 poseen diferentes propiedades catalíticas dando lugar a pequeñas diferencias en sus productos finales de hidrólisis.^{101,102} Las xilanasas GH-10 son capaces de actuar sobre enlaces glicosídicos cercanos a la sustitución o de las ramificaciones y de esta manera originan mayoritariamente productos de bajo peso molecular. Las enzimas de la familia GH-11 actúan sobre moléculas de xilano lineales o espacios con menos ramificaciones.^{102, 103}

Las arabinofuranosidasas son enzimas que escinden los residuos terminales α -L-arabinosa (α -L-Ara) del AX. Las arabinoxilan-arabinofuranohidrolasas (AXH) se dividen de acuerdo con sus especificidades de sustrato, las AXH-m actúan sobre las uniones (1-2) y (1-3) α -L-Ara monosustituidas en residuos β -D-xilosa (β -D-Xil) y las AXH-d3 sólo liberan unidades (1-3) α -L-Ara a partir de β -D-Xil disustituidos.¹⁰³ Debido a la estructura ramificada de las hemicelulosas, las AXH son importantes enzimas accesorias que eliminan los grupos laterales de la estructura polimérica favoreciendo la actividad de las endoxilanasas. Entre éstas se encuentran la glucuronidasa, acetilxilano esterasa, feruloilesterasa y cumaroilesterasa.⁹⁸

Las enzimas antes mencionadas actúan en diferentes sitios a lo largo de la cadena del AX para ocasionar su hidrólisis (en el Apéndice 1 se muestra un esquema de los sitios de escisión).¹⁰⁵ Para ser eficaces, los métodos enzimáticos requieren normalmente un tratamiento previo que aumente la accesibilidad de las enzimas al material hemicelulósico.^{71, 72}

1.5.3.1.2 Mecanismo de Acción de las Xilanasas. El mecanismo utilizado para la hidrólisis del sustrato corresponde a un doble desplazamiento con retención anomérica (β - β), en la Figura 1.9 (pp. 27) se muestra el mecanismo de acción. En la hidrólisis del enlace glucosídico por este mecanismo intervienen dos residuos de glutamato conservados del centro activo de la xilanasas actuando uno de ellos como catalizador ácido/base y el otro como residuo nucleofílico. Una vez que el esqueleto de xilosas ha sido posicionado correctamente entre los dos ácidos glutámicos catalíticos, el que actúa como catalizador ácido/base realiza un ataque ácido sobre el enlace glucosídico protonando el oxígeno de dicho enlace mientras el otro glutamato realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del enlace (ver Figura 1.9.A). De este primer paso se libera uno de los productos de reacción y se forma un intermediario α -glicosilo-enzima. Luego, el ion glutamato actúa como base y capta un protón de una molécula de agua, lo que permite que ésta ataque el carbono anomérico produciendo su hidrólisis (ver Figura 1.9.B). Lo anterior da genera un producto cuyo carbono anomérico vuelve a la misma configuración que en el sustrato (β - β) liberándose la enzima de su unión al sustrato para poder iniciar un nuevo proceso de catálisis.^{99,104} (ver Figura 1.9.C)

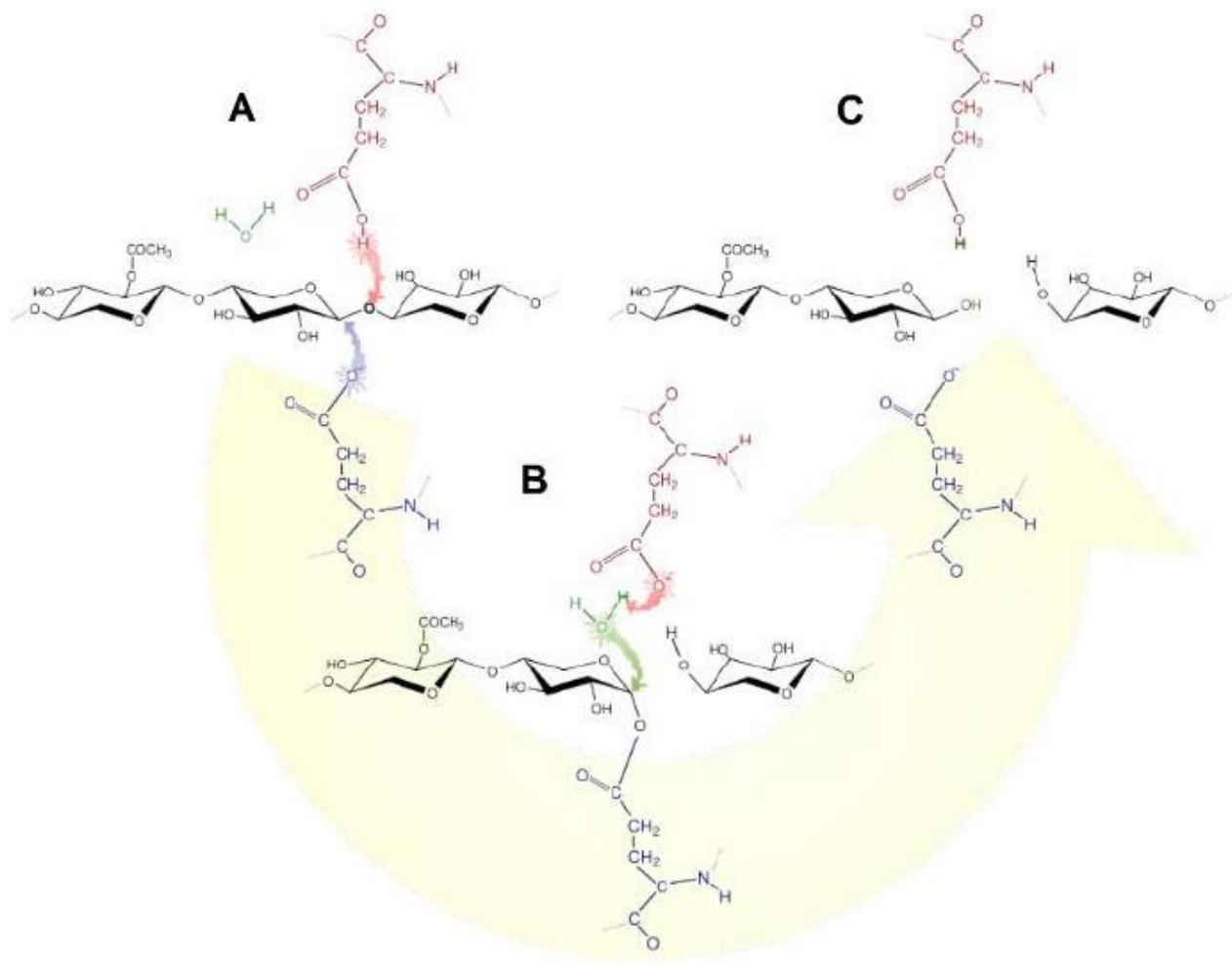


Figura 1.9 Mecanismo de acción de xilanasas.¹⁰⁴

1.5.3.1.3 Obtención de Oligosacáridos a partir de Enzimas. La producción de XOS a partir de residuos se puede realizar utilizando enzimas comerciales. Su utilización previene la formación de subproductos como la xilosa y el furfural, se incrementan los rendimientos y facilitan los procesos de purificación.⁷⁴ Akpinar y col. (2007) reportan un rendimiento de 53% de XOS a partir de tallos de algodón, utilizando la endoxilanasas Veron 191 (Paniplus). El rendimiento se vio afectado por los parámetros investigados (pH, temperatura, concentración de la enzima y concentración de sustrato); sin embargo, ninguno afectó el GP de manera significativa, a excepción del período de hidrólisis.⁷⁴ Vegas y col (2008) reportaron la obtención de XOS con diferente GP a partir de cáscara de arroz mediante la utilización de endoxilanasas con diferente especificidad como Pentopan Mono BG (Novozymes), Shearzyme 2x (Novozymes) y Pulpzyme HC (Novozymes).¹⁰⁵

1.5.4 Purificación de Oligosacáridos

Después de la producción, el proceso continua con una etapa de refino o purificación por lo que los polisacáridos de alto peso molecular, los azúcares de bajo peso molecular y otras moléculas que no tienen propiedades benéficas se separan del producto principal. El objetivo es eliminar compuestos no deseados manteniendo el contenido en oligosacáridos lo más alto posible. A nivel comercial el grado de pureza de los oligosacáridos prebióticos está en el intervalo de 75–95%. Entre las alternativas a seguir para este propósito se encuentran la concentración por evaporación y liofilización, la remoción por adsorción de compuestos no sacáridos, métodos cromatográficos, eliminación de sales por intercambio iónico, precipitación con disolventes orgánicos o inorgánicos, extracción con disolventes orgánicos y tecnologías de membrana.^{109, 110, 111, 112}

1.5.5 Análisis Estructural de los Oligosacáridos

Las características estructurales de los oligosacáridos obtenidos dependen del xilano original presente en la biomasa utilizada. Dentro de los métodos instrumentales para el análisis de oligosacáridos, los métodos tradicionales, como la cromatografía en papel o la cromatografía en capa fina (CCF), proporcionan alternativas útiles y rápidas para la separación y proporcionan una idea para la identificación.¹¹³

Los oligosacáridos pueden separarse por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), usando columnas de fase reversa, columnas amino-gel de sílice o resinas de intercambio iónico sulfonadas conteniendo iones calcio, plomo o plata. El empleo de cromatografía por exclusión de tamaño molecular (cromatografía de permeación en gel, CPG) permite la separación e identificación directa de oligosacáridos y proporcionan información de la distribución de pesos moleculares. La cromatografía de gases (CG) también tiene un lugar en el análisis de oligosacáridos, particularmente para los estudios estructurales; sin embargo, las muestras necesitan ser derivatizadas.¹¹⁴

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica muy importante que permite determinar la estructura de los oligosacáridos, la RMN bidimensional es útil para la determinación de la posición y configuración de las uniones glicosídicas.^{115, 116}

La espectrometría de masas es una técnica que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga. MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) es una técnica utilizada en espectrometría de masas de suave ionización que tiene la ventaja de proporcionar valores de masas exactos y el número exacto de monosacáridos presente en un oligosacárido. Una desventaja de MALDI-TOF es que se trata de una técnica destructiva.¹¹⁷

La mayoría de las técnicas de separación mencionadas anteriormente se emplean de manera complementaria a la hidrólisis química o enzimática de los oligosacáridos. Un análisis estructural típico de un oligosacárido complejo comprende la hidrólisis ácida parcial o por enzimas específicas, seguidas por separación e identificación de los productos de hidrólisis. Esta combinación de métodos aporta información estructural que no puede obtenerse exclusivamente por análisis de metilación, RMN o técnicas cromatográficas. Con ello puede obtenerse la secuencia de monómeros que constituyen la cadena principal del oligosacárido, la distribución de las ramificaciones y sus sustituyentes.¹¹⁸

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Industria de la Tortilla

En México, la industria de la tortilla procesa el maíz a través del método conocido como nixtamalización, en el cual los granos son sometidos a un cocimiento a pH alcalino. El maíz obtenido después del proceso de cocción se denomina nixtamal, mientras que el agua residual se conoce como nejayote. El nejayote contiene sólidos entre los que se encuentra el pericarpio de maíz y residuos de cal. Se reporta que en la producción de harina de maíz nixtamalizada se procesan diariamente por planta entre 90 y 250 toneladas de maíz obteniendo de 2.7 a 7.5 toneladas de pericarpio nixtamalizado (PMN) (Gruma comunicación personal, 2010).

La composición del pericarpio de maíz se muestra en la TABLA II (pp. 32). El PMN¹¹⁹ posee una composición diferente al pericarpio intacto.⁸⁰ La nixtamalización provoca la solubilización de los componentes del pericarpio de maíz, disminuyendo los sólidos no solubles generalmente asociados a lignina, además elimina la proteína presente, lo cual es favorable para los procesos de obtención y purificación de oligosacáridos.

El contenido de hemicelulosa disminuye por el proceso de nixtamalización; sin embargo, a pesar de las modificaciones ocasionadas, el pericarpio procesado contiene hemicelulosa suficiente para ser convertido en oligosacáridos. Por otra parte, conserva un porcentaje de ácido ferúlico que también puede ser aprovechado. Por lo tanto, la producción de oligosacáridos a partir de este residuo es considerada un área de oportunidad.

TABLA II
COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PERICARPIO DE MAÍZ

Constituyente	Pericarpio de maíz intacto⁸⁰ % (p/p)	Pericarpio de maíz nixtamalizado¹¹⁹ % (p/p)
Glucosa	30	31
Hemicelulosa	50	40
Xilosa	34	29
Arabinosa	16	11
Proteína	3	NR
Ácido ferúlico	3	2
Residuos sólidos no solubles	NR	5
Otros	14	22

2.2 Justificación

El empleo de materiales lignocelulósicos, especialmente los de carácter agrícola, da como resultado la obtención de componentes bioactivos por ejemplo los oligosacáridos y compuestos fenólicos.¹²⁰ La mayoría de los estudios a partir de este tipo de materias primas se centran en aislar y determinar actividades biológicas por separado. Los XOS y AXOS que han tenido un creciente interés por su potencial prebiótico pueden presentar también actividad antioxidante proporcionada por compuestos fenólicos, dependiendo de la naturaleza de la materia prima.^{79, 120, 121}

Hasta el momento no hay información reportada sobre estudios encaminados a la transformación de los residuos de la industria de la tortilla en oligosacáridos prebióticos, y los estudios de determinación de actividad prebiótica y actividad antioxidante se han realizado por separado.

Por esta razón el objetivo de este proyecto es la obtención de XOS y AXOS a partir de PMN, la determinación de su actividad prebiótica y la determinación de su actividad antioxidante.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL PROYECTO

3.1 Hipótesis

Los oligosacáridos obtenidos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado poseen actividad prebiótica y antioxidante.

3.2 Objetivo general

Obtener oligosacáridos a partir de pericarpio de maíz nixtamalizado y determinar la actividad prebiótica y antioxidante en estudios *in vitro*.

3.3 Objetivos específicos

- Obtener xilooligosacáridos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado utilizando métodos físico-químicos.
- Obtener xilooligosacáridos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado utilizando métodos biológicos.
- Purificar los oligosacáridos obtenidos de los procesos hidrolíticos.
- Caracterizar químicamente los productos obtenidos de la hidrólisis del pericarpio de maíz.
- Evaluar la actividad antioxidante de los oligosacáridos *in vitro*.
- Evaluar la actividad prebiótica de los oligosacáridos obtenidos en estudios *in vitro*.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología descrita a continuación se llevó a cabo en laboratorios del CELAES de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Vigo, España.

4.1 Materia Prima

El pericarpio de maíz utilizado fue donado por GRUMA, S.A. de C.V. Se utilizaron dos tipos de pericarpio provenientes de diferentes procesos de nixtamalización, el PMN-A y PMN-B. Para los estudios autohidrolíticos en reactores Parr, se utilizó un lote diferente obtenido de un proceso no identificado (PMN-C).

4.2 Hidrólisis biológica

4.2.1 Determinación de la Composición Química del Pericarpio de Maíz Nixtamalizado

La composición química de los lotes de pericarpio PMN-A y PMN-B fue determinada.

4.2.1.1 Determinación de Humedad (H).

Se pesó 1.0 g de PMN en un recipiente de peso conocido, el cual se secó previamente en la estufa hasta alcanzar peso constante. Posteriormente, se colocó la muestra en una estufa a 105 °C hasta peso constante. El contenido de humedad se expresó como gramos de agua por cada gramo de materia prima húmeda y se calculó con la siguiente ecuación.¹²²

$$H = \frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS} \quad (1)$$

Donde:

- PRMH: Peso del recipiente seco con la muestra húmeda inicial. (expresado en gramos)
- PRMS: Peso del recipiente con la muestra seca. (expresado en gramos)
- PRS: Peso del recipiente seco. (expresado en gramos)

4.2.1.2 Determinación del Contenido de Extracto Alcohólico (CE).

Se pesaron 3 g de PMN de humedad conocida y se introdujo en el equipo Soxhlet. En el matraz de extracción (de peso conocido) se depositaron 100 mL de etanol al 96%. Se llevó a cabo la extracción a reflujo durante 16 horas. El PMN se separó y se dejó secar a temperatura ambiente para análisis posteriores. El matraz de extracción, conteniendo el etanol y el extracto, se llevó a sequedad en un evaporador al vacío donde se eliminó el etanol por evaporación a vacío a 45 °C. Posteriormente el matraz se colocó en una estufa a 105 °C durante 24 h para acabar de secar el extracto y se llevó hasta peso constante. El contenido en extracto se expresó como gramos de extractos en 100 g de PMN en base seca y se calculó con la siguiente ecuación:¹²²

$$CE = \frac{PRMS - PRS}{PMH * (1 - H)} * 100 \quad (2)$$

Donde:

- PMH: Peso de la muestra húmeda inicial (expresado en gramos)
- PRMS: Peso del recipiente con la muestra seca (expresado en gramos)
- PRS: Peso del recipiente seco (expresado en gramos)
- H: Humedad de la muestra

4.2.1.3 Hidrólisis Ácida Cuantitativa (HAC).

La hidrólisis ácida cuantitativa se realizó en dos etapas, la primera con H₂SO₄ al 72% (v/v) que rompe los polisacáridos a oligómeros y una segunda etapa con H₂SO₄ al 4% que rompe estos oligómeros a monómeros. Mediante la determinación de la concentración de estos monómeros se calculó el contenido en polisacáridos de la muestra inicial. Al finalizar la HAC quedó un residuo sólido denominado lignina de Klason.

Se pesaron 0.5 g de PMN libre de extractos con un contenido de humedad conocida en un tubo de ensayo y se añadió 5 mL de H₂SO₄ al 72% en peso y se colocaron los tubos de ensayo en un baño de agua a 30 °C y se mantuvieron 1 hora con agitación periódica (primera etapa). Al finalizar este periodo, el contenido de los tubos de ensayo se transfirió a frascos arrastrando el PMN que pueda quedar adherido a las paredes utilizando agua destilada y se llevó el peso de disolución a 148.67 g totales. Los frascos se cerraron y se introdujeron en una autoclave. Se mantuvo la autoclave a 2 atm durante 1 hora (segunda etapa con H₂SO₄ al 4%). Los frascos se sacaron, se enfriaron y se determinaron las pérdidas originadas durante la segunda etapa. El contenido de cada frasco se filtró a través de un crisol Gooch (tamaño de poro N°3) de peso conocido. El líquido filtrado se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de índice de refracción (CLAR-IR) para determinar su concentración en azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa), ácido acético, furfural y HMF. A partir de los datos de concentraciones se calculó el contenido en los polímeros que se hidrolizaron para dar lugar a los monómeros medidos de la muestra analizada. El contenido en polímeros (CPs), en gramos de polímero/100 gramos PMN en base seca, se determinó mediante la fórmula:¹²²

$$CPs = F * C_{Est} * \frac{[A]}{p} * \frac{P + PMH * H}{PMH * (1 - H)} * (100 - CE) \quad (3)$$

Donde:

- F: Factor que corrige la degradación de los azúcares.
- C_{Est}: Factor de corrección estequiométrico (para tener en cuenta el aumento del peso molecular durante la hidrólisis).
- [A]: Concentración del monómero en g/L.

- ρ : Densidad de la disolución analizada en g/L (dado que las muestras suelen diluirse en agua para su análisis en CLAR, el valor de ρ es aproximadamente 1000 g/L). El valor medido en el laboratorio es de 1024 g/L.
- P: Peso de agua en gramos añadido y corregido para tener en cuenta las pérdidas durante la segunda etapa de HAC.
- PMH: Peso total del PMN en gramos.
- H: Humedad del PMN en g de agua/g PMN húmedo.
- CE: Contenido en extractos (este último término se incluye para referir los resultados al PMN inicial, antes de eliminar los extractos).

Los valores habituales de los parámetros F y C_{Est} para las distintas fracciones del MLC se muestran en la TABLA III.

TABLA III
VALORES PARA PARÁMETROS F Y C_{Est} ¹²²

	Glucano	Xilano y Arabinano	Grupos acetilo
	Glucosa	Xilosa/arabinosa	Ácido acético
F	1.04	1.088	1.00
C_{Est}	162/180	132/180	43/60

4.2.1.4 Determinación del Contenido en Lignina de Klason (CLK). El crisol utilizado para filtrar el producto de la HAC se introdujo en una estufa a 105 °C hasta llevar a peso constante, se enfrió en un desecador y se pesó. El aumento de peso experimentado por el crisol corresponde a la denominada lignina de Klason y se calculó (en g de lignina de Klason/100 g PMN, en base seca) mediante la siguiente ecuación:¹²²

(4)

$$CLK = \frac{PRMS - PRS}{PMH * (1 - H)} * (100 - CE)$$

Donde:

- PMH: Peso de la muestra húmeda inicial que se sometió a la HAC. (expresado en gramos)
- PRMS: Peso del crisol con la muestra seca. (expresado en gramos)
- PRS: Peso del crisol seco (expresado en gramos)
- H: Humedad de la muestra
- CE: Contenido en extractos

4.2.1.5 Determinación de la Relación de Arabinosa/Xilosa. Para calcular la relación Ara/Xil se utilizaron los datos obtenidos del análisis de composición y se sustituyeron en la siguiente ecuación:¹²³

$$\frac{Ara}{Xil} = \frac{[Arabinosa\ total] - [Arabinosa\ monomérica]}{[Xilosa\ total] - [Xilosa\ monomérica]}$$

(5)

4.2.2 Solubilización de Hemicelulosa

Para la solubilización de hemicelulosa se realizó un tratamiento autohidrolítico en autoclave y se probaron diferentes tratamientos alcalinos.

4.2.2.1 Autohidrólisis en Autoclave.

Para la autohidrólisis en la autoclave, el PMN se lavó con metanol al 80%, se secó y molió hasta obtener un polvo semifino (tamiz de 1 mm de malla).

La hidrólisis se llevó a cabo a una presión de 24 Lb_f/in² durante un periodo de 3 horas midiendo la concentración de carbohidratos totales por el método fenol-ácido sulfúrico y la concentración de azúcares reductores liberados por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalciílico cada 30 minutos. La pérdida de ácido ferúlico se estimó utilizando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, el cual se describirá más adelante. Los hidrolizados fueron centrifugados a 4000 rpm durante 20 minutos y la hemicelulosa se precipitó del sobrenadante con 2 volúmenes de etanol frío. El sólido fue separado y liofilizado.

4.2.2.2 Tratamiento Alcalino.

El PMN se sometió a un tratamiento alcalino para una mayor extracción de hemicelulosa. El tratamiento alcalino consistió en utilizar NaOH o KOH a una temperatura de 35 °C durante 3 horas. Además se realizó hidrólisis alcalina en autoclave. Se utilizaron diferentes concentraciones y condiciones reportadas en la literatura. Los métodos alcalinos utilizados fueron seis y las condiciones se describen en la TABLA IV. Posteriormente al tratamiento alcalino, la hemicelulosa fue extraída como se describe en el punto 4.2.2.1.

TABLA IV
CONDICIONES DE LOS MÉTODOS ALCALINOS UTILIZADOS EN LA SOLUBILIZACIÓN DE HEMICELULOSA

Método	Solubilización (3 h)	Extracción alcalina (35 °C, 3 h)
M1	Autohidrólisis, 24 Lb _f /in ²	KOH 24%, NaBH ₄ 1%
M2	Autohidrólisis, 24 Lb _f /in ²	NaOH 24%
M3	Autohidrólisis, 24 Lb _f /in ²	NaOH 4%
M4	Hidrólisis alcalina (NaOH 4%), 24 Lb _f /in ²	-----
M5	Hidrólisis alcalina (NaOH 4%), 12 Lb _f /in ²	-----
M6	-----	NaOH 24%

4.2.3 Hidrólisis enzimática

La hemicelulosa solubilizada fue tratada con la enzima comercial Veron 191 (Paniplus) que presenta actividad endoxilanasas. La reacción de hidrólisis enzimática se llevó a cabo por una mezcla de 1.1 U/mL de la endoxilanasas comercial con 10 mL de 2% de la hemicelulosa solubilizada en 50 mM de buffer de citrato, pH 5.4. La agitación se mantuvo a 150 rpm y la temperatura a 40 °C. Se tomaron muestras de 1 mL a intervalos regulares y se inactivaron por calentamiento a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras fueron analizadas midiendo azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y por cromatografía en capa fina (CCF). El cálculo del rendimiento en la producción de oligosacáridos se obtuvo mediante la siguiente ecuación:¹²²

(6)

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{producto (g)}}{\text{sustrato (g)}} * 100$$

4.2.3.1 Purificación.

El producto obtenido de la reacción con la enzima Veron 191 recibió un tratamiento con etanol frío para precipitar los compuestos de alto peso molecular y purificó por medio de cromatografía en columna. El soporte utilizado fue sílica gel. La fase móvil utilizada fue acetato de etilo: acetona: agua (2:5:1). Se recolectaron 80 fracciones y se analizaron por CCF. Las fracciones de interés se reunieron por similitud cromatográfica.

4.3 Hidrólisis Físico-química

4.3.1 Determinación de la Composición Química del Pericarpio de Maíz Nixtamalizado.

El contenido en humedad, extractos, polímeros y lignina de Klason en el PMN-C se determinaron como se describió en el apartado 4.2.1.

4.3.1.1 Determinación del Contenido en Ceniza (CC).

Se pesaron 2.0 g de PMN en un crisol de peso conocido. El crisol se llevó al horno de mufla a baja temperatura y se subió poco a poco en intervalos de 75°C hasta alcanzar 575 °C y se mantuvo a esta temperatura hasta alcanzar peso constante. El contenido en ceniza se expresó como los gramos de ceniza en 100 g de pericarpio de maíz nixtamalizado y se calculó con la siguiente ecuación.¹²²

(7)

$$CC = \frac{PRC - PRS}{(PRMH - PRS) * (1 - H)} * 100$$

Donde:

- PRC: Peso del crisol con las cenizas (expresado en gramos).
- PRS: Peso del crisol seco (expresado en gramos).
- PRMH: Peso del recipiente crisol con la muestra inicial (expresado en gramos).
- H: Humedad de la muestra.

4.3.1.2 Determinación de Ácidos Urónicos.

Se tomaron 2 g de muestra del líquido procedente de la segunda etapa de la HAC y se diluyeron hasta 6 g de agua. De esta disolución se tomaron 0.5 mL para 4 tubos de ensayo que contenían 3 mL de disolución de tetraborato sódico cada uno (12.5 mM en H₂SO₄). Todo esto se realizó en baño de hielo. Las muestras fueron homogenizadas y se pusieron en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos, se dejaron enfriar y se agitaron. Posteriormente, a tres de los tubos se añadió 0.1 mL de *m*-fenilfenol (0.15% en NaOH 0.5 %) y al otro tubo se añadió 0.1 mL de NaOH 0.5 % y se utilizó como blanco. Las muestras se agitaron y se dejaron 30 minutos en oscuridad. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 520 nm. Para calcular la concentración se realizó una recta de calibrado con ácido glucurónico como estándar, y la concentración se expresó en equivalentes en ácido glucurónico. La concentración en ácidos urónicos se calculó mediante la siguiente ecuación: ¹²²

(8)

$$CPS = F * C_{Est} * \frac{[A]}{p} * \frac{P + PMH * H}{PMH * (1 - H)} * (100 - CE)$$

Donde:

- F: 1.00
- C_{Est}: 212/230
- [A]: Concentración de ácido glucurónico.
- *p*: Densidad de la disolución analizada en g/L (el valor de *p* es aproximadamente 1000 g/L). El valor medido en el laboratorio es de 1024 g/L.
- P: Peso de agua en gramos añadido y corregido para tener en cuenta las pérdidas durante la segunda etapa de HAC.
- PMH: Peso total del PMN en gramos.

- H: Humedad del PMN en g de agua/g PMN húmedo.
- CE: Contenido en extractos.

4.3.1.3 Determinación del Contenido de Almidón.

El almidón se cuantificó usando un kit de ensayo de referencia comercial STA20, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.

4.3.1.4 Determinación del Contenido de Proteína.

El contenido de proteína se estimó a partir del contenido de nitrógeno total, mediante la ecuación $\% \text{ proteína} = 6.25 \times \text{N}$. El nitrógeno total se determinó mediante un analizador elemental de C-N-S-Cl (Thermo Quest, Modelo FLASH 1112 Series, NC Soil Analyzer).

4.3.1.5 Determinación del Contenido de Ácido Ferúlico.

Se pesaron 20 mg de PMN en un matraz Erlenmeyer y se añadió 1 mL de NaOH 2M. El matraz se colocó en agitación a 150 rpm y en oscuridad durante 2 h a 45 °C. Posteriormente, el pH se ajustó a 2 con 0.6 mL de H₃PO₄ 3.5 M, y las muestras se extrajeron dos veces con acetato de etilo en una relación 1:3 (v:v) durante 20 minutos. La fase orgánica se separó por decantación, el disolvente se eliminó en un rotaevaporador a vacío a 45 °C. El sólido se disolvió en 2 mL de metanol y se analizó por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (CLAR-DAD).⁴³

4.3.2 Eliminación de Almidón

El PMN se molió hasta obtener un polvo semifino (tamiz de 1 mm de malla) antes de su tratamiento en el reactor Parr. El PMN se sometió a un tratamiento previo para eliminar el almidón el cual consistió en una autohidrólisis no isotérmica hasta alcanzar 130 °C. La relación de líquido/sólido (RLS) utilizada fue de 8:1 g agua / g de materia seca, en un reactor agitado de acero inoxidable (Compañía Parr Instrument 4550) de 0.6 a 3.75 L de volumen total, equipados con dobles hélices de turbinas de seis aspas. Después de los tratamientos, la suspensión se filtró y el sólido se lavó, se secó al aire y se analizó la composición usando los mismos métodos que para la materia prima descritos en los apartados 4.2.1 y 4.3.1.

4.3.3 Evaluación de RLS sobre la Solubilización de la Hemicelulosa por Procesos Autohidrolíticos no Isotérmicos

Con el fin de causar la solubilización de hemicelulosa, el sólido de la extracción acuosa se sometió a autohidrólisis (en el mismo reactor descrito en el apartado 4.3.2). Se evaluaron las siguientes condiciones de RLS: 8:1, 10:1 o 12:1 g agua / g de materia seca. Las temperaturas máximas de prueba estuvieron en intervalo 195-220 °C. Una vez que la temperatura evaluada fue alcanzada, el reactor se enfrió, y los sólidos se recuperaron por filtración, se lavaron y se secaron antes del análisis.

Los efectos combinados de temperatura y tiempo para los tratamientos de autohidrólisis no isotérmicas se midieron por el factor de severidad. El factor de severidad se define como:¹²⁴

(9)

$$R_0 = \int_0^t \exp\left(\frac{T(t) - T_{ref}}{w}\right) \cdot dt$$

Donde:

- T: Temperatura (° C)
- t: Tiempo en minutos
- T_{ref}: Temperatura de referencia (°C), con un valor de 100 °C.
- ω: Parámetro empírico relacionado con la energía de activación, con valor de 14.75 °C⁻¹.

4.3.3.1 Generación de Oligosacáridos.

En la fase líquida obtenida en los tratamientos autohidrolíticos (licores) se encuentran los productos de solubilización de las hemicelulosas, que son mayoritariamente oligómeros de composición muy heterogénea.

4.3.3.1.1 Determinación del Contenido Seco (CS). Se pesaron 2 g de los licores de autohidrólisis en un recipiente de peso conocido previamente tarado. Posteriormente, la muestra se colocó en una estufa a 105 °C y se llevó a peso constante. El contenido seco se expresó como gramos de residuo seco / gramo de licor y se calculó con la siguiente ecuación:¹²²

(10)

$$CS = \frac{PRMS - PRS}{PRMH - PRS}$$

Donde:

- PRMH: Peso del recipiente seco con la muestra húmeda inicial (expresado en gramos)
- PRMS: Peso del recipiente con la muestra seca (expresado en gramos)
- PRS: Peso del recipiente seco (expresado en gramos)

4.3.3.1.2 Análisis Directo de Licores. Las muestras líquidas de los tratamientos de autohidrólisis se filtraron a través de membranas de 0.45 micras y se analizaron para glucosa, xilosa, arabinosa, ácido acético, 5-hidroximetilfurfural y furfural por CLAR-IR, y para compuestos fenólicos por CLAR-DAD.

4.4.3.1.3 Posthidrólisis. La cuantificación directa de los oligosacáridos mediante cromatografía o técnicas similares no es posible, por lo que se llevó a cabo una posthidrólisis de esta fase líquida con H₂SO₄ al 4% para determinar la cantidad de oligómeros por el aumento de la concentración de los monómeros. Las condiciones de esta posthidrólisis han sido previamente optimizadas para conseguir una conversión cuantitativa de los oligómeros a monómeros. El aumento de la concentración de monosacárido y ácido acético causado por la posthidrólisis proporciona una medida de la concentración de oligosacárido

Para realizar la posthidrólisis, se pesaron de 1 a 10 mL de la fase líquida y se añadió H₂SO₄ hasta lograr una concentración de ácido sulfúrico del 4% en peso en un frasco roscado, los frascos se cerraron, se pesaron y se introdujeron en una autoclave, la cual se mantuvo a 121 °C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, los frascos se enfriaron y se pesaron para determinar las pérdidas originadas. Las muestras líquidas después de la posthidrólisis se filtraron a través de membranas de 0.45 micras y se analizaron por CLAR-IR.

Los oligosacáridos (en g equivalentes de monómeros/L) se expresaron mediante la siguiente ecuación:¹²²

(11)

$$[AO] = F_p * \frac{[P]}{P_{disolución} - P_{ácido}} * [A]_p - [A]$$

Donde:

- [AO]: Representa la concentración de la especie A en los oligosacáridos equivalente en monómeros (en g/L).
- F_p : Factor que corrige la degradación de los azúcares durante la posthidrólisis. (TABLA V)
- P: Peso de agua en gramos añadido corregido para tener en cuenta las pérdidas.
- $P_{\text{disolución}}$: Peso total de disolución.
- $P_{\text{ácido}}$: Peso de H_2SO_4 añadido.
- $[A]_p$: Concentración del monómero A tras la posthidrólisis (g/L).
- $[A]$: Concentración inicial de dicho monómero en la fase líquida (g/L).

La fracción $P / (P_{\text{disolución}} - P_{\text{ácido}})$ corrige los efectos que la adición de ácido y de las pérdidas de agua ocasionan sobre el volumen total de la fase líquida y por lo tanto, sobre la concentración de los distintos compuestos.

TABLA V
VALORES PROMEDIO DEL PARÁMETRO F_p ¹²²

Fracción	Especie	F_p
Glucoligosacáridos	glucosa	1.053
Xilooligosacáridos	xilosa	1.064
Arabinooligosacáridos	arabinosa	1.064

4.3.3.2 Contenido Fenólico.

Con el fin de evaluar la presencia de compuestos fenólicos en los licores de autohidrólisis se determinó el contenido de fenoles y se realizaron extracciones líquido-líquido con acetato de etilo.

Las muestras de licores se extrajeron dos veces con acetato de etilo a una proporción 1:3 (v/v). La fase orgánica se separó por decantación, y el disolvente se eliminó por evaporación a vacío. Los licores de autohidrólisis y los extractos de acetato de etilo se analizaron para fenoles totales y actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos totales se determinaron por el método colorimétrico de Folin y Ciocalteu (1927) modificado por Singleton y Rossi (1965).¹²⁵ En el método original se utilizó (Folin, 1927) un reactivo de molibdotungsteno en el que por la oxidación de fenoles se obtiene un producto de color que presenta una absorbancia máxima a 745-750 nm.¹²⁵ En el método modificado se utiliza un reactivo heteropolianión (molibdo tungstofosfórico) que reduce fenoles más específicamente, el máximo de absorbancia para el producto es 765 nm.¹²⁶ La reacción se realizó con 0.5 mL de muestra, 3.75 mL de agua destilada y 0.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) de fuerza media (FC se diluyó 1:1 en agua destilada). Después la mezcla se agitó y se añadió 0.5 mL de Na₂CO₃ al 10%. El contenido se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 60 minutos. El blanco se preparó con agua destilada y se siguió el mismo procedimiento. La absorbancia de la mezcla se midió utilizando un espectrofotómetro a 765 nm. Para determinar la concentración se preparó una recta patrón con un estándar de ácido gálico en un intervalo de concentración de 0-100 mg/L. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (EAG).

El rendimiento en compuestos fenólicos (CF) liberados a la fase acuosa tras la hidrólisis se expresó en gramos de EAG / 100 g de materia seca. El extracto resultante se utilizó para calcular el rendimiento de sólidos solubles en acetato de etilo (SSAE) y se expresa como gramos de compuestos solubles en acetato de etilo /100 g de materia seca.

El rendimiento de recuperación en compuestos fenólicos solubles en acetato de etilo (FSAE) se expresó como g EAG /100 g de materia seca. La concentración relativa de los compuestos fenólicos en el extracto liofilizado (CFE) se midió en g EAG / g de extracto.

Los extractos de acetato de etilo se analizaron por CLAR-DAD, los compuestos fenólicos se identificaron por comparación del tiempo de retención y datos espectrales en el UV-visible con los estándares.

4.3.3.3 Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante de los compuestos es ejercida por diferentes mecanismos, por lo que es necesario medir esta capacidad mediante varios ensayos, de modo que los compuestos se puedan evaluar mejor. La actividad antioxidante de los licores de autohidrólisis y extractos de acetato de etilo se determinó mediante ensayos diferentes como la actividad antioxidante equivalente a Trolox (por sus siglas en inglés TEAC, Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), poder antioxidante de reducción del hierro (por sus siglas en inglés FRAP, Ferric Reducing Antioxidant Power) y poder reductor. Además, la capacidad de estabilizar radicales libres por el método de captación del radical libre 1,1-difenil- 2-picril hidracilo (DFPH) se determinó en los extractos.

4.3.3.3.1 Capacidad Antioxidante Equivalente en Trolox. El ensayo se realizó de acuerdo con el procedimiento sugerido por Re y col. (1999). Este ensayo se basa en la captación del catión radical (ABTS^{•+}) [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)], el cual se genera directamente en una forma estable antes de la reacción con el antioxidante. El catión radical ABTS se produce mediante la reacción de una solución madre de ABTS 7 mM con persulfato de potasio 2.45 mM (concentración final) y dejando reposar la mezcla en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas antes de su uso. La solución de ABTS se diluyó con tampón fosfato salino (PBS a pH 7.4) hasta una absorbancia de 0.700 a 734 nm. 2.0 mL de esta solución se añadieron a 20 µL de extracto o estándar de Trolox. La mezcla se dejó reaccionar durante 6 minutos en un baño de agua a 30 °C y la absorbancia se midió a 734 nm. El blanco empleado fue PBS. El ABTS presenta un color verde intenso y el decremento en la absorbancia refleja la disminución de la especie reactiva. Para determinar la concentración se preparó una recta patrón con un estándar de Trolox en un intervalo de concentración de 0.2 a 2 mM. Los resultados se expresaron como equivalentes de Trolox.^{41,127}

4.3.3.3.2 Poder Reductor. El poder reductor de las muestras se determinó según el método propuesto por Oyaizu (1986), el cual se basa en la reducción química de Fe (III) a Fe (II). Las sustancias que tienen potencial de reducción, reaccionan con ferrocianuro de potasio (Fe³⁺) para formar ferrocianuro de potasio (Fe²⁺), que entonces reacciona con el cloruro férrico para formar un complejo férrico ferroso que tiene un máximo de absorción a 700 nm.⁵² La muestra (1 mL) se mezcló con 2.5 mL de tampón fosfato 0.2 M (pH 6.6) y 2.5 mL de ferricianuro de potasio al 1.0%, y la mezcla se incubó a 50 °C durante 20 minutos. Después se adicionó 2.5 mL de ácido tricloroacético al 10%, la mezcla se centrifugó y se tomaron 2.5 mL y se mezclaron con 2.5 mL de agua y 0.5 mL de FeCl₃ al 0.1%. La absorbancia se leyó a 700 nm. La recta patrón se realizó con ácido ascórbico como estándar en un intervalo de concentraciones de 0.1 a

1 mM y los resultados se expresaron como equivalentes de ácido ascórbico (EAA). El blanco utilizado fue agua destilada.¹²⁸

4.3.3.3.3 Poder Antioxidante de Reducción del Hierro. El método FRAP es un ensayo colorimétrico que se basa en la capacidad de un compuesto para reducir la férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe^{3+} -TPTZ) al complejo ferroso 2,4,6-tri-piridil-s-triazina (Fe^{2+} -TPTZ) de color azul en condiciones ácidas. El reactivo se preparó a partir de tampón de acetato 300 mM (pH 3.6), 10 mM de 2,4,6-tri-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) en 40 mM de solución de HCl y 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada en una proporción (10:1:1 v/v). La muestra (100 μL) se mezcló con 3 mL del reactivo FRAP y se dejó reaccionar durante 6 minutos. La absorbancia se midió a 593 nm. El blanco fue agua destilada. Para determinar la concentración se preparó una recta patrón con un estándar de ácido ascórbico en un intervalo de concentración de 0.12 a 1 mM. Los resultados se expresaron como EAA.^{41,129, 130}

4.3.3.3.4 Captación del Radical Libre α,α -difenil- β -picrilhidrazilo. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con von Gadow, Joubert, y Hansmann (1997). Este ensayo se basa en la medición de la capacidad de captación del radical estable DFPH• por los compuestos antioxidantes. El radical DFPH• libre en su forma oxidada presenta un color púrpura intenso y tiene un máximo de absorbancia de radiación ultravioleta a 517 nm, este radical se reduce a la correspondiente hidrazina cuando reacciona con donantes de hidrógeno. A 50 μL de la muestra se añadieron 2 mL de DFPH 3.6×10^{-5} M en solución metanólica. La concentración inicial de radical DFPH• y la concentración final de éste después de reaccionar con el antioxidante fueron medidas, la absorbancia a 515 nm se registró después de 16 minutos. La disminución en la absorbancia se traduce en una disminución de la concentración de esta especie reactiva por captación de electrones por la especie antioxidante. La concentración media efectiva (CE_{50}) se calculó como la concentración de compuestos fenólicos requeridos para neutralizar el 50% del radical DFPH inicial.^{41,131}

4.3.3.4 Evaluación de Oligosacáridos Ferulados.

Para cuantificar el ácido ferúlico esterificado en los licores de autohidrólisis se realizó una hidrólisis alcalina. Se tomó 1 mL del licor y se colocó en viales de color ámbar, se añadió 1 mL de agua o de NaOH 0.4 M. Los viales se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente, y a continuación se añadió 1.5 mL de H₃PO₄ 0.4 M seguido por 1 mL de NaOH 0.4 M o agua, según lo que no tenía añadido previamente.⁷⁹ Las muestras después de la reacción de hidrólisis fueron analizadas por CLAR-DAD. El contenido de ácido ferúlico esterificado se determinó por la diferencia entre el contenido de ácido ferúlico de las muestras antes y después de la hidrólisis alcalina.

4.3.3.5 Análisis de los Sólidos después de la Autohidrólisis.

Los sólidos gastados se utilizaron para la determinación del rendimiento gravimétrico. Muestras de los sólidos gastados se analizaron para determinar su composición química como se describió en los apartados descritos en las secciones 4.2.1 y 4.3.1.

4.3.4 Hidrólisis Enzimática de los Oligosacáridos Presentes en los Licores de Autohidrólisis.

Los licores de autohidrólisis se trataron con enzimas endoxilanasas para disminuir el GP; sin embargo, los oligosacáridos presentes en los licores presentaban un alto grado de ramificación que impedía actuar a las enzimas por lo que se realizó una prehidrólisis antes del tratamiento enzimático.

4.3.4.1 Prehidrólisis.

Para favorecer el ataque enzimático se realizó una prehidrólisis de los licores de autohidrólisis. Se realizó un análisis previo de distintas condiciones para evaluar el mayor rompimiento de los oligosacáridos presentes en los licores con la menor liberación de monosacáridos. La prehidrólisis se llevó a cabo en un reactor Parr, las condiciones evaluadas fueron: 105 °C con H₂SO₄ al 0.5% (0, 1, 2, 5, 7, 10 y 20 minutos) y 120 °C con H₂SO₄ al 0.5% (0, 1, 2, 3, 4 y 5 minutos). Las muestras fueron tomadas a los tiempos indicados y se analizaron por CLAR-IR y CPG.

4.3.4.2 Selección de Enzimas.

Los licores de autohidrólisis fueron tratados con xilanasas comerciales de forma individual y en combinación. Las enzimas comerciales y las condiciones óptimas de reacción utilizadas se muestran en la TABLA VI.

TABLA VI
CONDICIONES DE LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS DE LOS LICORES DE AUTOHIDRÓLISIS

Experimento	Enzima	pH
1	Pulpzyme HC (Noovozymes)	6.0
2	Shearzyme 2x (Novozymes)	4.5
3	Veron 191 (Paniplus)	5.4
4	Pulpzyme HC / Shearzyme 2x	5.5
5	Pulpzyme HC / Veron 191	5.5
6	Shearzyme 2x / Veron 191	5.0

Los licores de autohidrólisis se colocaron en matraces Erlenmeyer y el pH se ajustó y se añadió la xilanasas comercial en cada caso. La agitación se mantuvo a 40 °C y 120 rpm.

La reacción se llevó a cabo durante 48 horas y fue monitoreada tomando 1 mL de muestra a intervalos regulares. La muestra se inactivó por calor a 100 °C durante 5 minutos. Las muestras fueron analizadas midiendo la liberación de azúcares reductores por el método de Somogyi-Nelson y monosacáridos por CLAR-IR.

4.3.5 Purificación de Oligosacáridos

Para la purificación de AXOS se utilizó la tecnología de membranas en el modo de nanofiltración.

4.3.5.1 Selección de Membrana.

Se evaluaron tres tipos de membranas con el objetivo de seleccionar la de mayor porcentaje de retención del compuesto de interés, menor ensuciamiento después del análisis y facilidad de recuperación de la permeabilidad de la misma. Las membranas utilizadas fueron Amicon (Millipore), polimérica y cerámica, todas de tamaño de corte de 1 KDa.

La configuración experimental empleada con las membranas polimérica y cerámica consistió en un tanque de alimentación de 10 L (en el que la temperatura se controló con el paso de agua del grifo a través de un serpentín de refrigeración), una bomba de diafragma, dos medidores de presión situados uno en la entrada y otro en la salida de la membrana para medir la presión transmembrana (TMP), una válvula de aguja situada después de la membrana para alcanzar la TMP deseada, y un medidor de flujo para medir el flujo de reciclaje. El esquema experimental se muestra en la Figura 4.1 (pp. 58).

Los experimentos se llevaron a cabo en un sistema cerrado usando los licores de autohidrólisis como alimentación, para medir el flujo permeado (J) a diferentes TMP en el rango de presiones especificadas de cada una de las membranas (polimérica en un rango de 0-4 bar y cerámica en un rango de 0 a 10 bar), operando sucesivamente de menor a mayor presión.

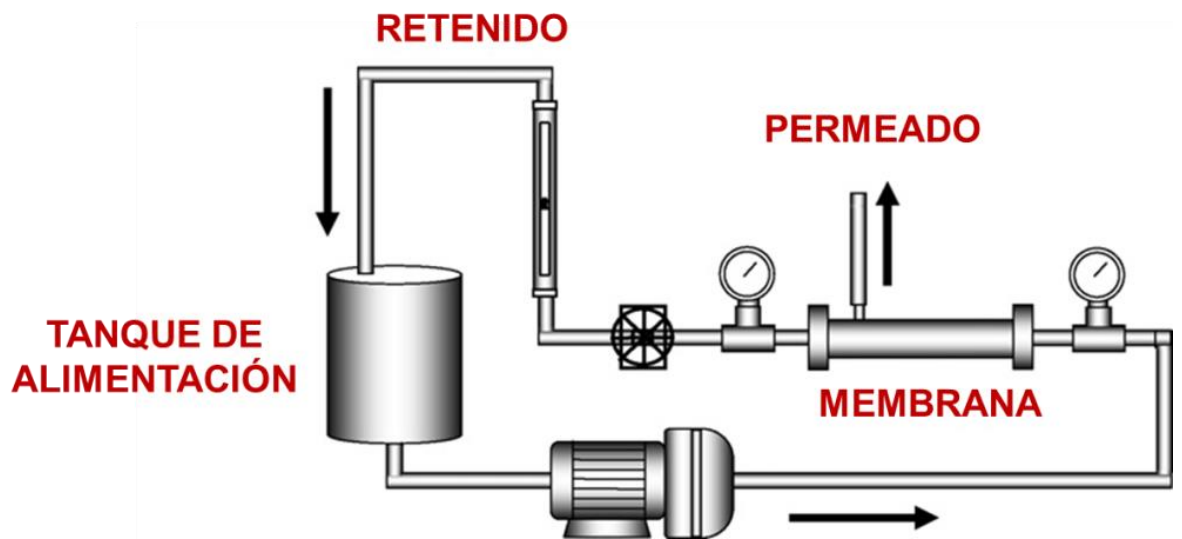


Figura 4.1 Esquema experimental de la purificación con tecnología de membranas.

El ensuciamiento de la membrana se evaluó mediante la medición de la permeabilidad al agua antes y después de los experimentos. Después, las membranas se limpiaron en modo de recirculación total durante 30 minutos a 40 °C con una solución de detergente (1% Ultrasil 11), y se enjuagaron con agua antes de volver a medir la permeabilidad.

En los experimentos llevados a cabo con la membrana Amicon no es posible medir la TMP, se mide la presión del sistema a través de la presión dada por un tanque de nitrógeno unido al dispositivo.

Los licores retenidos y refinados se analizaron para conocer su composición usando los mismos métodos anteriormente citados para licores de autohidrólisis. La retención para un compuesto dado i se define como:¹¹²

(11)

$$R_i = \left(1 - \frac{C_{p,i}}{C_{r,i}}\right) * 100$$

Donde:

$C_{p,i}$: Concentración del compuesto i en el permeado

$C_{r,i}$: Concentración en el retenido correspondiente

4.3.5.2 Diafiltración Continua.

Para la purificación, los licores de autohidrólisis se sometieron a diafiltración continua (DC) utilizando la membrana seleccionada. La DC consistió en añadir agua al tanque de alimentación al mismo flujo que el flujo de permeado, con el fin de mantener el procesamiento a un volumen constante. El volumen de filtrado acumulado se mide generalmente en términos de volúmenes de diafiltración (VD, un volumen de diafiltración corresponde a un volumen de permeado igual al volumen de la alimentación original). En este trabajo, la DC se llevó a cabo hasta un VD de 8 L.

4.3.6 Caracterización Química de Oligosacáridos

Los oligosacáridos obtenidos se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución, cromatografía de intercambio iónico y espectrometría de masas. Los azúcares reductores se midieron por el método de Somogyi-Nelson.

4.3.6.1 Cromatografía de Permeación en Gel de Alto Rendimiento.

La distribución del peso molecular de los oligosacáridos se determinó por CPG utilizando una columna TSKgel G3000PWXL (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania), 300 x 7.8 mm, a temperatura de 30 °C con un detector de índice de refracción. La fase móvil utilizada fue agua destilada a un flujo de 0.6 mL / min. Dextranas (1-80000 g / mol), XOS (GP 2 a 6) y AXOS (GP 3 y 7) fueron utilizados como patrones de calibración.

4.3.6.2 Cromatografía de Intercambio Aniónico.

Las muestras se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico con detección amperométrica pulsada de alto rendimiento (HPAEC-PAD) usando un sistema de cromatografía de ICS3000 (Dionex, Sunnyvale, EE.UU.), equipado con una columna CarboPac, 250 x 2 mm, en combinación con un guarda columna CarboPac PA 25 x 2 mm y un detector PAD ISC3000. Se utilizó un flujo de 1 mL / min con las fases móviles A (agua destilada), B (0.2 M NaOH), y C (NaOAc 2 M en 0.2 NaOH). Oligosacáridos (GP 2 a 6) se utilizaron como patrones.

4.3.6.3 Espectrometría de masas por desorción-ionización mediante láser asistido por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

Los análisis de MALDI-TOF se realizaron utilizando una estación de trabajo Ultraflex (Bruker Daltonics), equipada con un láser de nitrógeno 337 nm. Las mediciones se realizaron en el modo positivo. Después de un tiempo de extracción retardada de 150 ns, los iones se aceleraron con una tensión de 25 kV. Se recogieron datos de 100 disparos láser, utilizando la menor energía necesaria para obtener los espectros de intensidad suficiente. El espectrómetro de masas se calibró con una mezcla de xilooligosacáridos (DP = 2-6) de Megazyme.

Para la preparación de la muestra, 1 μl de solución de muestra (1 mg/ml) se mezcló con 1 μl de matriz (10 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico de Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) en 30% de acetonitrilo (v/v), aplicado directamente sobre el objetivo de la placa de MS, y se secó bajo una corriente de aire caliente

4.3.7 Evaluación de la Actividad Biológica de los Oligosacáridos

4.3.7.1 Determinación de la Actividad Prebiótica de Oligosacáridos en Estudios *in vitro*.

El potencial prebiótico de los oligosacáridos liofilizados fue evaluado *in vitro* por fermentación discontinua de las muestras por microbiota fecal humana. Las fermentaciones se monitorearon por consumo de las fuentes de carbono, la producción de AGCC, ácido láctico y el efecto bifidogénico, además se midió el pH y la producción de gas.

Los inóculos se hicieron a partir de muestras fecales frescas recogidas de humanos voluntarios sanos, que por lo general ingieren una dieta normal y no han presentado enfermedades digestivas ni recibido antibióticos durante al menos 3 meses. Las heces se recogieron en viales estériles, sellados y se mantuvieron a 37 °C hasta la preparación de la fermentación (no más de 2 horas después de la recolección). El inóculo fecal se diluyó en solución salina fisiológica reducida (0.5 g/L cisteína-HCl y 8.5 g/L de NaCl) al 10% p/v. Antes de su uso y durante la preparación del inóculo, se mantuvieron en anaerobiosis por burbujeo continuo de CO₂ y N₂ a pH 6.8. La suspensión se mezcló y se homogeneizó durante 2 minutos bajo corriente de CO₂ y N₂, después se filtró a través de cuatro capas de gasa quirúrgica para eliminar material sólido no disuelto y se transfirió a botellas de suero.

El medio base de nutriente utilizado en las fermentaciones contiene 5.0 g/L caldo de soya tripticasa (TSB) sin dextrosa, 5.0 g/L bactopectona, 5.0 g/L de base de levadura de nitrógeno (YNB), 0.5 g/L clorhidrato de cisteína, 1.0% (v/v) de solución A (100 g/L de NH_4Cl , 10 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), solución de minerales, 0.2% (v/v) de solución B (200 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y 0.2% (v/v) de 0.5 g/L de solución de resazurina y se preparó en agua destilada. El pH final del medio se ajustó a 6.8. El medio se desoxigena por burbujeo continuo de CO_2 y N_2 , alícuotas de 8.0 mL fueron dispensadas en tubos herméticos de cultivo anaeróbico que se sellaron con tapones de aluminio antes de ser esterilizados en autoclave. Las soluciones stock de YNB, los oligosacáridos purificados y FOS (control positivo) fueron esterilizadas por filtración en botellas herméticas estériles. Las cantidades de los diferentes componentes del medio final así como la concentración del inóculo fecal se adicionaron de acuerdo a la Tabla VII. Todas las adiciones y las inoculaciones se realizaron en el interior de una campana de anaerobiosis (5% H_2 , 10% CO_2 y 85% N_2).

TABLA VII
COMPOSICIÓN FINAL DE MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO PARA LA
FERMENTACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS

Componente	Concentración inicial (g/L)	Volumen añadido (mL)	Concentración final en el medio (g/L)
Medio base	---	8	---
YNB	62.5	0.8	5
Oligosacáridos	50	1	5
Inóculo fecal	100	0.2	2
Total	---	10	---

Los cultivos se incubaron bajo condiciones anaerobias a 37 °C por 48, se tomaron muestras a diferentes tiempos a lo largo de la fermentación.

4.3.7.1.1 Consumo de Oligosacáridos. El consumo del OS fue monitoreado por CLAR-IR. Se analizaron alícuotas de muestras directas de la fermentación y a una segunda alícuota se realizó una posthidrólisis.

4.3.7.1.2 Generación de AGCC y Lactato. Los productos de fermentación fueron analizados por CLAR-IR.

4.3.7.1.3 Efecto Bifidogénico. La cuantificación de bifidobacterias en cultivos discontinuos se llevó a cabo mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ*, usando *Bif164*, sondas dirigidas a regiones específicas del gen del ARNr 16S del género de *Bifidobacterium* marcadas con tinte fluorescente Cy3, la secuencia diana (5'-3') fue CATCCGGCATTACCACCC.¹³² Un mL de cada muestra se centrifugó a 15.000 x g durante 2 minutos para separar la materia particulada, las muestras se lavaron dos veces con PBS, se centrifugaron y se resuspendieron en 375 µL de PBS. Las muestras resuspendidas se fijaron durante la noche en paraformaldehído (4 g paraformaldehído/ 100 g solución) a 4 °C en relación muestra / paraformaldehído de 1:3 (v:v). Las células se lavaron con tampón fosfato (0.1 M, pH 7.0), y se resuspendieron en 150 µL de PBS y 150 µL de etanol, y se almacenaron a -20 ° C durante al menos 1 h antes del procesamiento adicional.

En tubos eppendorf de 1.5 mL se preparó la solución de hibridación que contenía 500 µL de tampón de hibridación (40 mmol/L de Tris-HCl pH 7.2, 1.8 mol/ L de NaCl y 20 mL de una solución que contiene 100 g de dodecil sulfato sódico/ L), 160 µL de agua destilada estéril y 40 µL de las células fijadas.

En un tubo eppendorf se colocaron 5 µL de la sonda (50 ng/L), se mezclaron con 45 µL de la solución de hibridación, se agitaron y se incubaron durante la noche a 50 ° C.

En un tubo de centrifuga de 10 mL, se colocaron 5.0 mL de tampón de lavado (20 mmol/L de Tris-HCl pH 7.2 y 0.9 mol/L de NaCl), se añadió la mezcla de hibridación y 20 µL de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 500 ng/mL). La mezcla se incubó a 50 8383 durante 30 minutos. La mezcla de lavado se filtró a través de filtros Nuclepore Policarbonato 0.20 micras en vacío.

Los filtros se colocaron en portaobjetos y se cubrieron con cubreobjetos. Los portaobjetos se almacenaron en la oscuridad a 4 °C durante un máximo de 3 días, y se examinaron usando un microscopio de fluorescencia (Olympus BX41) equipado con Fluorlenses. Se cuantificaron células totales y células hibridadas por triplicado y se contaron un mínimo de 15 campos por muestra analizada.

Las células se reportaron como Log de células por mililitro mediante la siguiente ecuación:¹³²

(13)

$$\text{Log} \frac{\text{cél}}{\text{ml}} = \text{Log}(F_{\text{total}} * M * N_{\text{campos}} * C_{\text{media}})$$

Donde:

- F_{total} : Factor de dilución total. = (375/300) * (700/40) * (40/36)
- M : Relación entre muestra total / muestra hibridada. = (1 mL / 0.040 mL)
- N_{campos} : Número de campos microscópicos. Área de filtro / Área de objetivo = 201.06 / 0.0176715
- C_{media} : Promedio de las células contadas por campo.

4.3.7.2 Efecto de la Concentración de Oligosacáridos en la Actividad Antioxidante.

Las actividades antioxidantes de los AXOS se evaluaron a diferentes concentraciones a través de los métodos descritos en el apartado 4.3.3.3. La actividad antioxidante para los ensayos de FRAP y poder reductor se estimó como el incremento en la absorbancia a 700 y 593 nm, respectivamente. En los ensayos de TEAC y DFPH, en los que se mide una disminución en la absorbancia inicial del reactivo, la actividad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición de las especies reactivas de acuerdo a la siguiente ecuación: ⁴²

(14)

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \frac{Abs_{reactivo} - Abs_{muestra}}{Abs_{reactivo}} * 100$$

Donde:

- Abs: Absorbancia.

4.4 Análisis de Oligosacáridos

Para el análisis de oligosacáridos se utilizaron técnicas espectrofotométricas (método del ácido 3,5-dinitrosalicílico y método de Somogyi- Nelson, para determinación de azúcares reductores y el método fenol-H₂SO₄ para la determinación de carbohidratos totales) y cromatográficas (CCF y CLAR).

4.4.1 Azúcares Reductores

4.4.1.1 Método del Ácido 3,5-dinitrosalicílico.

En tubos de 13x100 se colocaron 0.4 mL de cada muestra a analizar y se le añadieron 0.4 mL del ácido 3,5-dinitrosalicílico. Los tubos con la mezcla fueron calentados a ebullición dejando reaccionar durante 5 minutos e inmediatamente después se pasaron a un baño de hielo, ahí mismo se llevaron a 2 mL con agua destilada fría y se agitaron. Finalmente, las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro. Un blanco fue preparado sustituyendo la muestra por 0.4 mL de agua destilada. Para determinar la concentración de azúcares reductores a través de los datos de absorbancia de las muestras, se preparó una curva estándar utilizando soluciones de xilosa en un intervalo de concentración de 0.0 a 0.1 g/L.¹³³

4.4.1.2 Método de Somogyi- Nelson.

En un tubo se colocaron 3 mL de muestra y 3 mL de reactivo de Somogyi, se homogenizaron e incubaron en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, las muestras se dejaron enfriar y se añadieron 2 mL de Reactivo de Nelson y 5 mL de agua destilada. Las muestras se homogenizaron y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm. El blanco se preparó con agua destilada. Para determinar la concentración de azúcares reductores a través de los datos de absorbancia de las muestras, se preparó una curva estándar utilizando soluciones de xilosa en un intervalo de concentración de 0.0 a 0.1 g/L.^{134, 135}

4.4.2 Carbohidratos Totales

Los carbohidratos totales se determinaron a través del método fenol- H_2SO_4 reportado por Dubois y col. (1956). En un tubo se colocaron 0.4 mL de muestra, 0.1 mL de fenol 8% y 1 mL de H_2SO_4 concentrado. La mezcla se agitó y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 20 minutos a temperatura de 25-30 °C. La absorbancia de la muestra se midió a 490 nm. El blanco se preparó con agua destilada. Para determinar la concentración de carbohidratos totales a través de los datos de absorbancia de las muestras, se preparó una curva estándar utilizando soluciones de xilosa en un intervalo de concentración de 0.0 a 0.01 g/L.¹³⁶

4.4.3 Cromatografía en Capa Fina

En la determinación de oligosacáridos por CCF se utilizaron placas de sílica gel. Las fases móviles utilizadas contenían acetato de etilo-ácido acético-agua (2:2:1 v/v). Posteriormente se empleó acetato de etilo-acetona-agua en proporciones (2:5:1 v/v). Se utilizó α -naftol en etanol, H_2SO_4 y agua (8:1:1 v/v) como revelador. El revelado de las placas se realizó a 100 °C.

4.4.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

4.4.4.1 CLAR- IR.

Para el análisis de azúcares por CLAR con detector de índice de refracción se utilizaron tres métodos diferentes:

1. Una columna Agilent Zorbax para carbohidratos. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo-agua (75:25) con un flujo de 0.8 mL/min a temperatura ambiente.

2. Una columna Aminex HPX-87H (BioRad, Hércules, CA), 300 x 7.8 mm en horno a 60 °C, se utilizó H₂SO₄ 0.003M como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min.
3. Una columna CARBOsep CHO 682 (Transgenomic, Glasgow, UK), 300 mm x 7.8. Esta columna es sensible a pH ácidos por lo que las muestras fueron neutralizadas con carbonato de bario antes de ser filtradas a través de membranas de 0.45 micras de acetato de celulosa. La columna se operó a 80 °C. Se utilizó agua destilada como fase móvil con un flujo de 0.4 mL / min.

4.4.4.2 CLAR- DAD.

Los compuestos fenólicos fueron analizados por CLAR con detector de arreglo de diodos (DAD). La columna utilizada fue Waters Spherisorb ODS-2 (5 micras, 250 mm x 4.6 mm). La composición de la fase móvil varió de acuerdo con un gradiente de disolvente A (acetonitrilo / 5% (v / v) de ácido fórmico en agua, 10:90) y el disolvente B (acetonitrilo / 5% (v / v) de ácido fórmico en agua, 90:10) a 0 min, 100% de A; 40 min, 85% de A, 15% de B; 45 min, 100% de B; 55 min, 100% de B; 60 min, 100 % de A. El flujo fue de 1 mL / min a temperatura de 30 °C.

4.5 Análisis Estadístico

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se utilizó estadística descriptiva como medias \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion. Los valores de p se utilizaron para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos mediante ANOVA simple y multifactorial según se diera el caso. Posteriormente, se utilizó una comparación múltiple de medias de la prueba de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher para determinar las diferencias.

4.6 Disposición de Residuos

Los residuos generados durante el desarrollo experimental de este proyecto fueron dispuestos en contenedores específicos de acuerdo a lo establecido por el Departamento de Residuos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Hidrólisis Biológica

5.1.1 Pericarpio de Maíz Nixtamalizado

La nixtamalización provoca cambios en la composición química del pericarpio de maíz, estas modificaciones están fuertemente asociadas con las condiciones del proceso.¹³⁷ En la producción de oligosacáridos a partir de MLC es de importante conocer la composición de la materia prima empleada debido a que la actividad biológica y las características estructurales de los oligosacáridos obtenidos dependen del xilano original presente en la biomasa a utilizar y de las condiciones operativas de obtención.¹³⁸

A pesar de la disponibilidad del PMN, la empresa no proporciona datos del proceso del cual proviene, por lo que la composición de los lotes de PMN provenientes de diferentes procesos de nixtamalización (PMN-A y PMN-B) se analizó. Los resultados obtenidos se muestran en la TABLA VIII 8 (pp. 71).

TABLA VIII
COMPOSICIÓN DEL PERICARPIO DE MAÍZ NIXTAMALIZADO
 (Expresado como g/100 g materia seca)

Componente	PMN-A	PMN-B
Glucano (almidón, celulosa, β -glucano)	45.32 ± 2.21^a	47.72 ± 2.28^a
Hemicelulosa		
Xilano	23.71 ± 0.60^b	22.55 ± 1.51^b
Arabinano	11.23 ± 0.29^c	10.46 ± 1.09^c
Lignina	13.88 ± 0.54^d	14.16 ± 0.71^d

Letras minúsculas en superíndices indican diferencias significativas ($p > 0.05$), media \pm DS, n = 3.

Como se puede observar, los datos de los componentes principales fueron similares y no fueron significativamente diferentes. Además, como era de esperarse según los reportes en la literatura, el tipo de hemicelulosa encontrado en el PMN fue arabinoxilano.⁶³ Por tanto, la hemicelulosa se midió en términos de xilano y arabinano. El contenido en arabinosa es comparativamente alto en los materiales agrícolas, la relación arabinosa:xilosa (Ara:Xil) indica el grado de ramificación. Una alta proporción de arabinosa sugiere que se trata de una cadena polimérica muy ramificada.⁶³ Las relaciones de Ara:Xil de los PMN-A y PMN-B fueron 0.47 y 0.46, respectivamente, lo cual indica que el PMN presenta un grado relativamente alto de ramificación.¹²³

5.1.2 Solubilización de Hemicelulosa

La estrategia para la obtención de oligosacárido depende del origen de la materia prima. El PMN es un pericarpio procesado, su hemicelulosa posiblemente se encuentre accesible para ser hidrolizada por tratamientos enzimáticos directos o las condiciones físico-químicas de obtención serán relativamente suaves. Con este supuesto, la solubilización de la hemicelulosa se inició a través de un proceso de autohidrólisis utilizando

una autoclave.

5.1.2.1 Autohidrólisis en Autoclave.

Para la extracción de la hemicelulosa se realizó la solubilización de dos tipos de pericarpio de maíz nixtamalizado (PMN-A y PMN-B) en una autoclave a 24 Lb_f/in². La concentración de carbohidratos totales y la concentración de azúcares reductores se midieron a diferentes tiempos. Los resultados para los pericarpios PMN-A y PMN-B se muestran en la Figura 5.1 (pp. 73). Los carbohidratos totales indican la solubilización de la hemicelulosa y se puede apreciar que conforme se va solubilizando también se va hidrolizando parcialmente, es decir, se van generando extremos reductores ocasionados por una disminución del peso molecular indicando una prehidrólisis que se puede medir con el incremento en la concentración de azúcares reductores.

Por otra parte, se puede observar que los dos tipos de pericarpio presentan comportamiento diferente, el PMN-B tiene una mayor pendiente lo que indica que se solubiliza más rápidamente, además pareciera que llega a una meseta donde la solubilización se detiene; sin embargo, continúa existiendo prehidrólisis debido a que la concentración de azúcares reductores sigue en aumento.

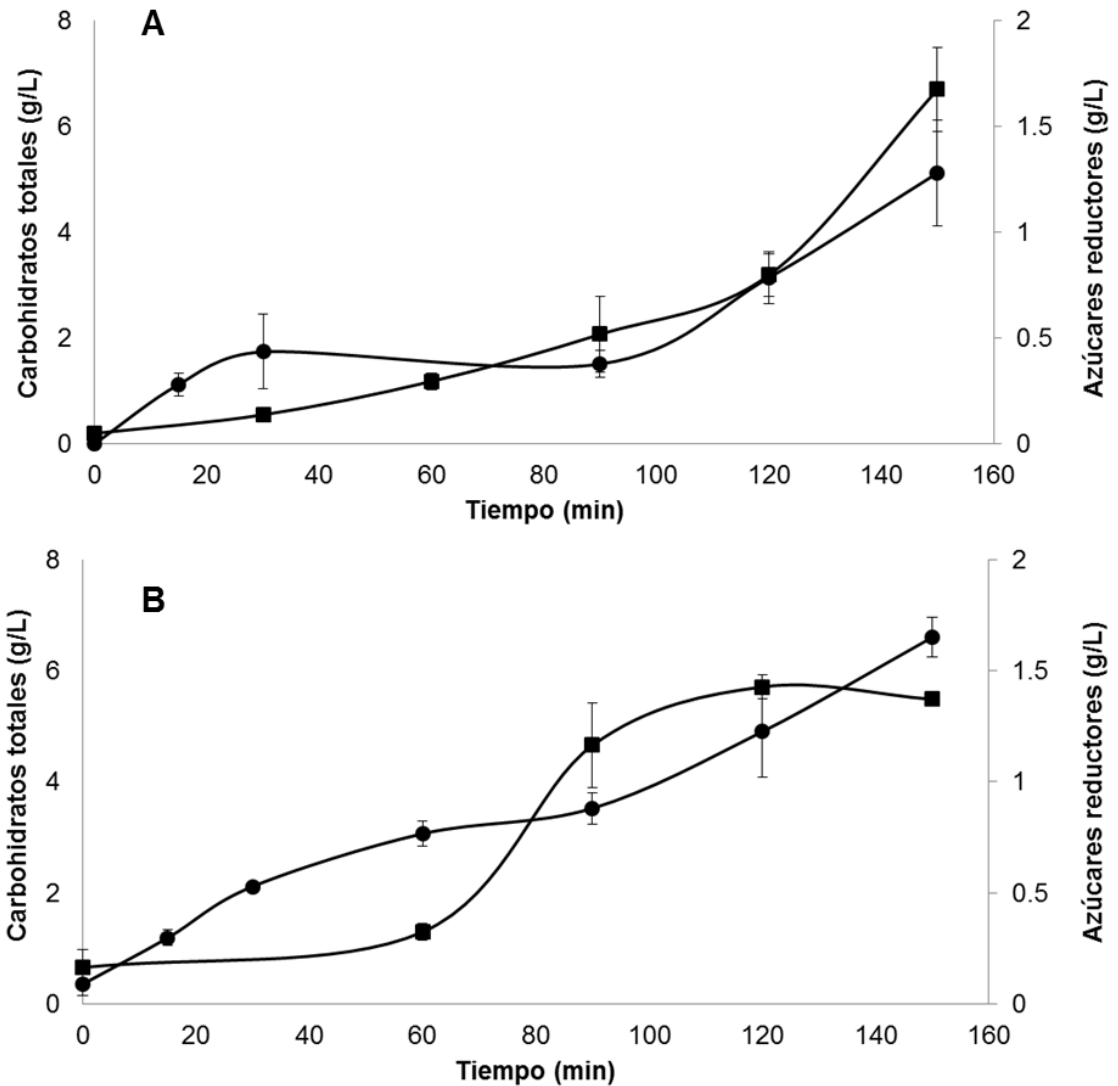


Figura 5.1 Cinética de hidrólisis del pericarpio de maíz nixtamalizado a $24\text{Lb}_f/\text{in}^2$.
A. PMN-A B. PMN-B. ■ Carbohidratos totales ● Azúcares reductores

Otro aspecto a evaluar durante el proceso de solubilización de la hemicelulosa fue la pérdida de ácido ferúlico. Esto se determinó midiendo la concentración de fenoles totales y tomando como un 100% la concentración total de ácido ferúlico presente en el PMN.

En la Figura 5.2 se presentan las gráficas para el pericarpio PMN-A y PMN-B. Se puede apreciar que la pérdida de ácido ferúlico por el proceso de solubilización es mínima y no existe diferencia significativa a través del tiempo; sin embargo, no se incrementó el tiempo de solubilización para no sobrecargar el equipo, por esta razón se decidió llevar a cabo el proceso durante 3 horas.

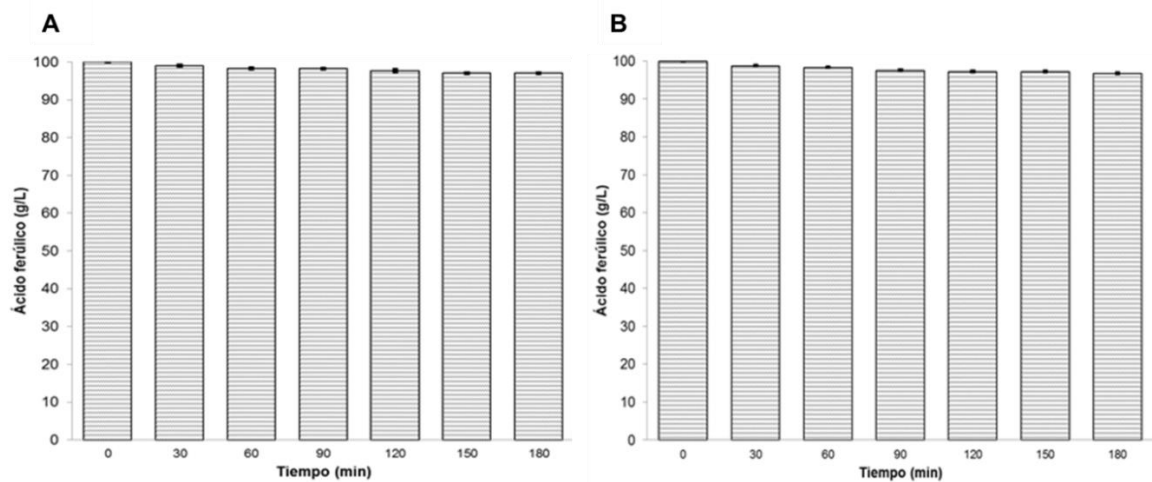


Figura 5.2 Efecto del tiempo de solubilización en autoclave del PMN sobre la pérdida de ácido ferúlico a 24Lb_f/in². A. PMN-A B. PMN-B. Fenoles totales como equivalentes de ácido ferúlico (g/L). ($p < 0.05$); $n=3$.

Después del período de solubilización, la hemicelulosa se precipitó y el sólido obtenido se liofilizó, obteniendo aproximadamente un 5% (p/p) de precipitado para ambos pericarpios. Este porcentaje es bajo respecto al total de hemicelulosa presente en el PMN. Por esta razón, se decidió analizar diferentes procesos de solubilización alcalina.

5.1.2.2 Tratamiento Alcalino.

Se probaron seis métodos diferentes de tratamiento alcalino. Los porcentajes de hemicelulosa obtenidos para los dos tipos de pericarpio son similares por lo que solo se presentan los resultados del pericarpio PMN-A, los cuales se muestran en la Figura 5.3.

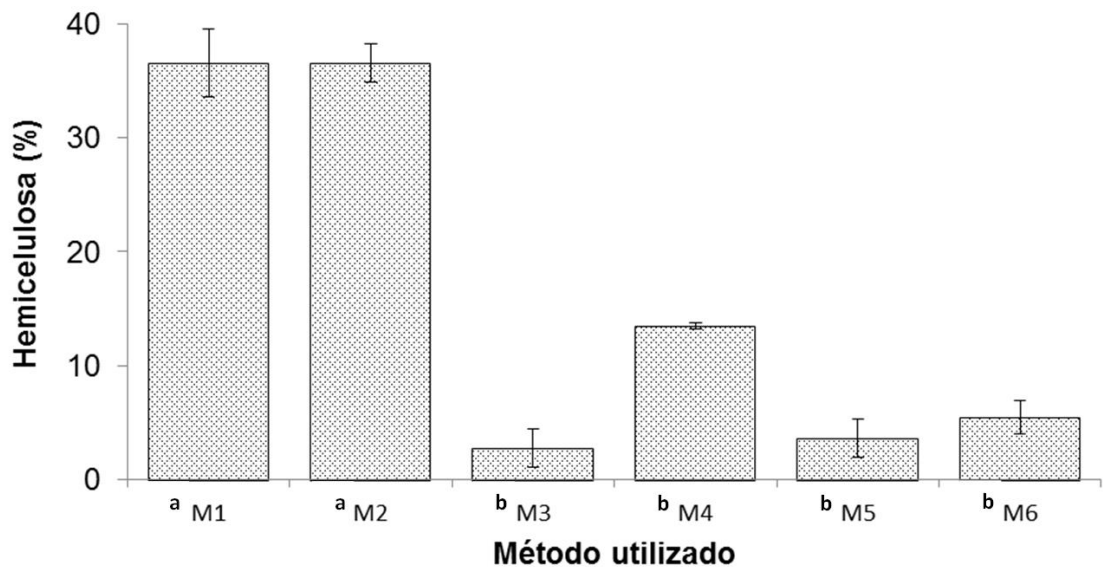


Figura 5.3. Comparación del rendimiento de hemicelulosa obtenido con los diferentes métodos de tratamiento alcalino para el PMN-A.

Letras minúsculas en superíndices indican diferencias significativas ($p > 0.05$), media \pm DS, $n = 3$.

Se puede observar que los métodos M1 y M2 (ver apartado 4.2.2.2) son los que presentan mayor porcentaje de hemicelulosa recuperada, alrededor de un 35%. Ambos métodos se caracterizan por tener un período de solubilización de 3 horas en autoclave a $24\text{Lb}_t/\text{in}^2$ *a priori* al tratamiento alcalino, el cual en ambos casos tiene la misma concentración de álcali. La diferencia entre ellos es que en el M1 se utilizó además NaBH_4 .

Tras este tratamiento, se determinó la pérdida de ácido ferúlico. La Figura 5.4 muestra el contenido de ácido ferúlico en el pericarpio PMN-A. Se puede apreciar que con el M1 existe mayor pérdida de ácido ferúlico que con el M2. Por lo cual se decidió utilizar el M2 como segundo tratamiento de obtención de hemicelulosa, el cual consistió en un proceso de autohidrólisis en el autoclave a 24 Lb_f/in² por 3 horas y una extracción alcalina con NaOH al 24% a 35 °C por 3 horas.

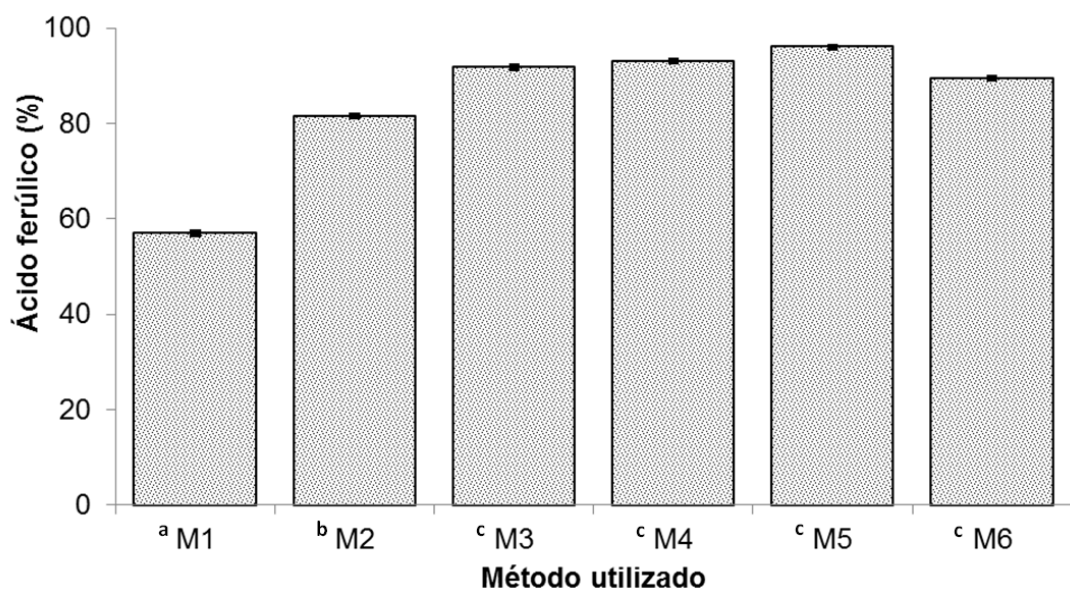


Figura 5.4. Comparación del rendimiento de ácido ferúlico obtenido con los diferentes métodos de tratamiento alcalino para el PMN-A.

Letras minúsculas en superíndices indican diferencias significativas ($p > 0.05$), media \pm DS, $n = 3$.

Para los experimentos de obtención de oligosacáridos se utilizaron los dos tipos de hemicelulosa obtenidos, la proveniente del tratamiento autohidrolítico en autoclave y la del tratamiento alcalino, de ambos tipos de pericarpio.

5.1.3 Obtención de Oligosacáridos

Aunque los rendimientos obtenidos en la autohidrólisis (autoclave) fueron bajos, la hemicelulosa obtenida en este proceso y la del proceso alcalino de ambos tipos de pericarpio, fueron sometidos a un proceso de hidrólisis enzimática con el fin de obtener oligosacáridos. Para lo cual se utilizaron endoxilanasas comerciales.

5.1.3.1 Hidrólisis enzimática.

Se realizaron reacciones enzimáticas con la enzima Veron 191 (Paniplus). La reacción enzimática con la enzima Veron 191 utilizando como sustrato la hemicelulosa proveniente del tratamiento alcalino, se muestreó cada hora durante un período de 10 horas y el seguimiento de la reacción se llevó a cabo por CCF; sin embargo, no se apreciaron productos de esta reacción. A pesar de que la hemicelulosa solubilizada por el método alcalino se obtuvo con un rendimiento siete veces mayor a la obtenida a través del tratamiento autohidrolítico en la autoclave, resultó ser sustrato con poca afinidad para las enzimas utilizadas, posiblemente debido al número de ramificaciones que impidieron su hidrólisis y a que la mayoría de las endoxilanasas son estéricamente impedidas por los sustituyentes de la cadena principal del xilano evitando la formación del intermediario enzima-sustrato.^{100,104}

Así mismo, se realizó la reacción enzimática entre la enzima Veron 191 y la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico en autoclave, se tomó muestra cada hora durante las primeras 15 horas de reacción, se evaluó la liberación de azúcares reductores y se analizó por CCF utilizándose estándares de arabinosa, celobiosa y xilosa. Los resultados para los pericarpios PMN-A y PMN-B se muestran en la Figura 5.5 (pp. 78). Las muestras antes de ser analizadas por CCF recibieron un tratamiento de purificación en el cual se precipitaron los compuestos de alto peso molecular con etanol frío.

Condiciones de reacción: 1.1 U/mL, 40 °C, pH 5.4, sustrato 2%

Fase estacionaria: Sílica gel

Fase móvil: Acetato de etilo – ácido acético – agua (2:2:1 v/v)

Revelador: α -naftol en etanol, H_2SO_4 y agua (8:1:1 v/v)

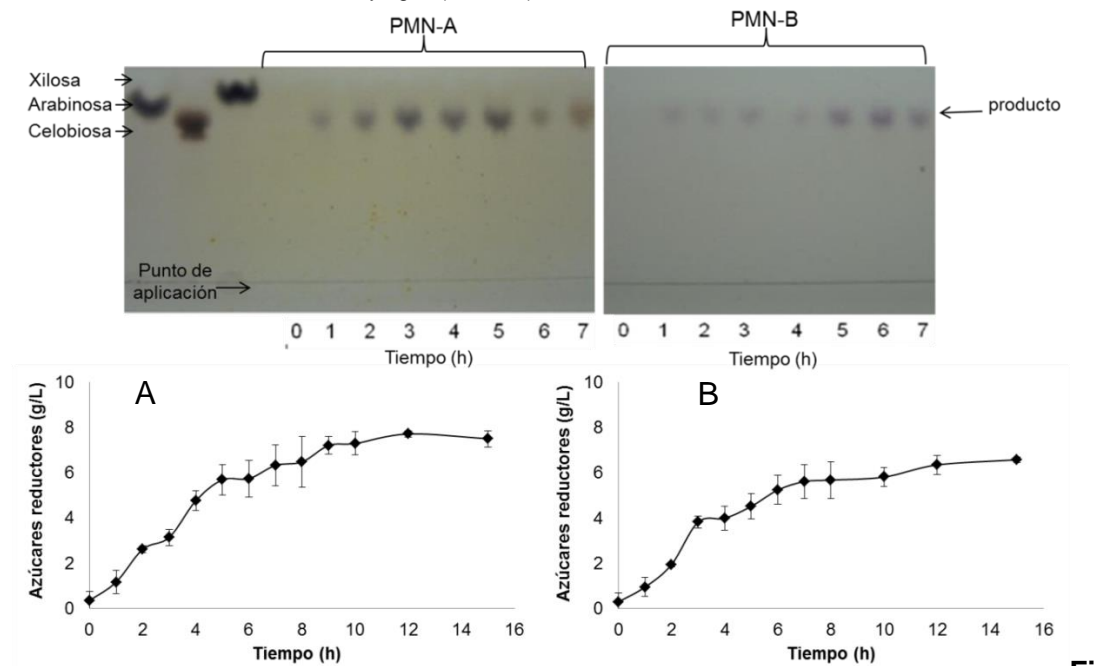


Figura 5.5 Comparación de las cinéticas de reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico con la enzima Veron 191. A. PMN-A B. PMN-B.

Como se puede apreciar, la liberación de azúcares de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico en autoclave de ambos tipos de pericarpios sucede en las primeras horas de reacción, además se obtiene para ambos casos un solo producto de mayor polaridad que la xilosa y conforme pasa el tiempo no hay mayor generación de productos. Por lo tanto se puede concluir que el tiempo no intervino con el tipo de producto obtenido.

También se realizó una reacción con mayor concentración de enzima Veron 191. El seguimiento de la reacción se realizó por CCF. La placa se muestra en la Figura 5.6 (pp. 79) en la cual se puede observar que al incrementar la cantidad de enzima también se incrementan los productos obtenidos y el compuesto generado con anterioridad se aprecia en mayor concentración.

Condiciones de reacción: 2.2 U/mL, 40 °C, pH 5.4, sustrato 2%

Fase estacionaria: Sílica gel

Fase móvil: Acetato de etilo – ácido acético – agua (2:2:1 v/v)

Revelador: α -naftol en etanol, H_2SO_4 y agua (8:1:1 v/v)

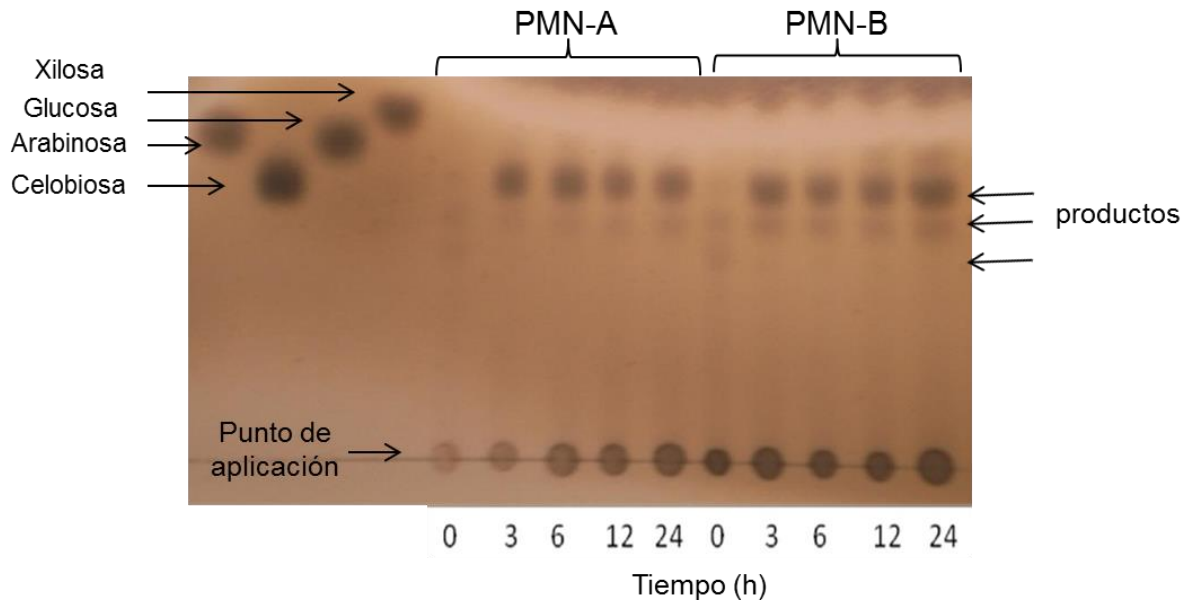


Figura 5.6 Placa cromatográfica del seguimiento de la reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico con mayor cantidad de enzima Veron 191.

La reacción de hidrólisis enzimática con la enzima Veron 191 en condiciones óptimas realiza cortes específicos cada dos unidades monoméricas, sin embargo, el aumento en la concentración de enzima resulta en un aumento en los productos obtenidos, lo que sugiere que en el sustrato hay más sitios disponibles para el ataque enzimático. Por otra parte, la generación de otros productos se puede deber a que las enzimas comerciales utilizadas son concentrados enzimáticos, no son enzimas puras, en donde pueden estar presentes endoxilanasas con diferente tipo de especificidad que estén generando oligosacáridos de diferente grado de polimerización y que en las reacciones con menor cantidad de enzima estos compuestos de menor concentración no alcanzan a ser detectados por los análisis cromatográficos.

Las muestras tomadas se analizaron por CLAR. En la Figura 5.7 se presentan los cromatogramas de la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa del pericarpio PMN-A. Se puede observar que el compuesto obtenido se detecta a las 6 horas de reacción y tiene un tiempo de retención de 9.25 min. Este tiempo de retención es mayor al tiempo de retención de los estándares de monosacáridos de pentosas (xilosa y arabinosa) y hexosas (glucosa y galactosa); y es menor al tiempo de retención de celobiosa, un disacárido de hexosa, lo que sugiere que el compuesto obtenido probablemente se trate de un disacárido de pentosas. Los tiempos de retención de los estándares analizados se muestran en la Figura 5.8 (pp. 81).

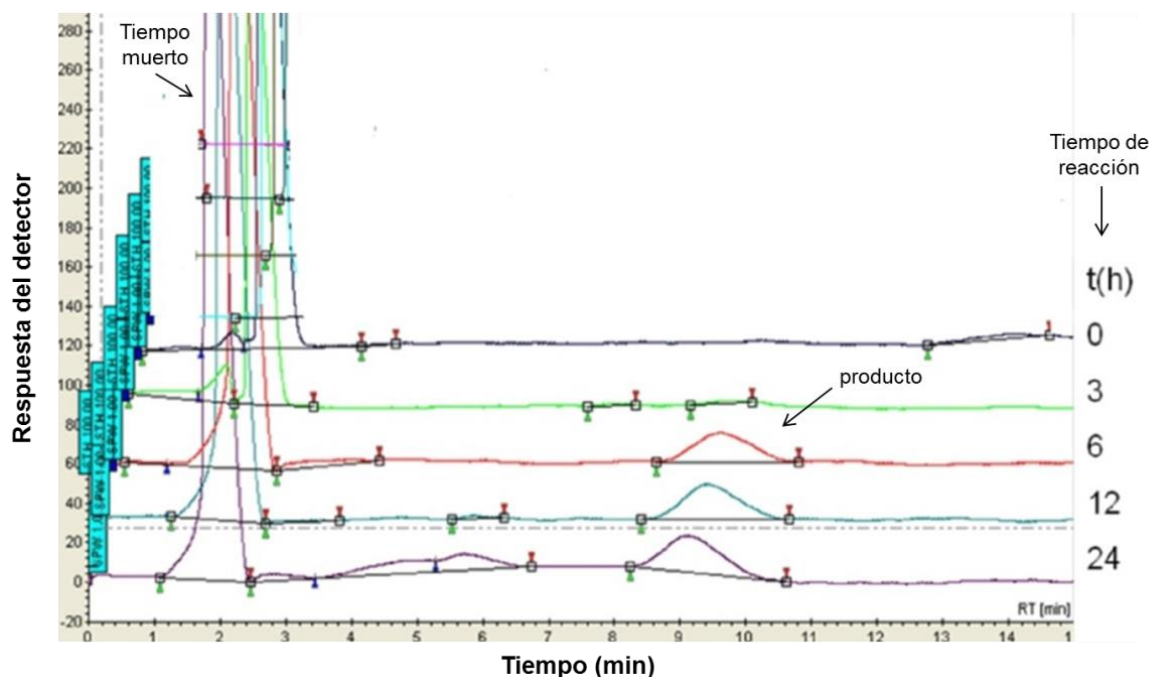


Figura 5.7 Cromatograma de CLAR. Reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico del PMN-A con mayor cantidad de enzima. Columna Agilent Zorbax para carbohidratos, fase móvil acetonitrilo-agua (75:25), flujo 0.8 mL/min.

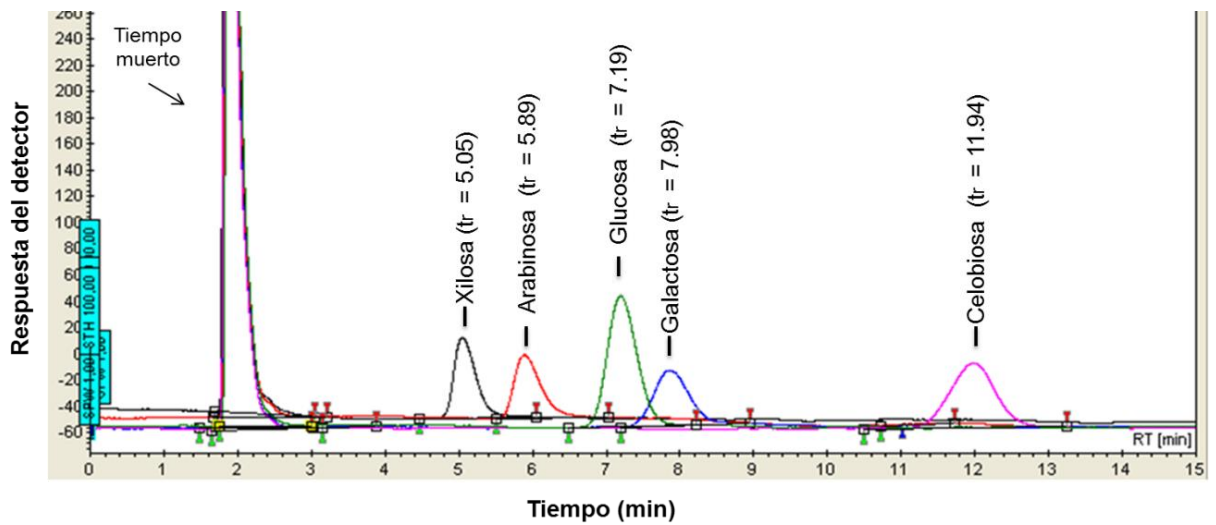


Figura 5.8 Cromatograma de CLAR. Estándares de carbohidratos. Columna Agilent Zorbax para carbohidratos, fase móvil acetonitrilo-agua (75:25), flujo 0.8 mL/min.

En la Figura 5.9 se muestran los cromatogramas del pericarpio PMN-B, donde se puede apreciar el producto obtenido, el cual aparece en el mismo tiempo de retención que el compuesto que se obtiene con el pericarpio PMN-A; sin embargo, este se detecta a las 3 horas de reacción. Además se aprecia una mayor generación de monómeros conforme pasa el tiempo.

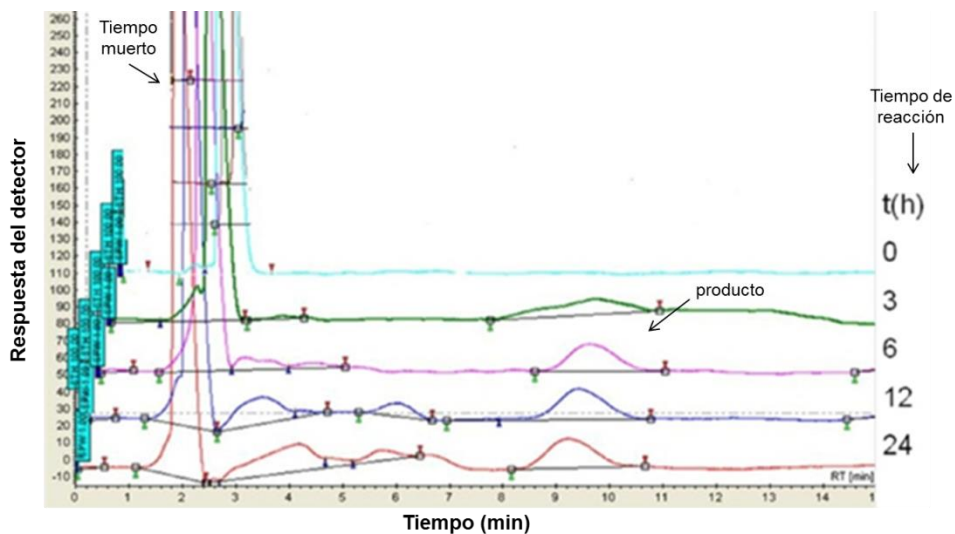


Figura 5.9 Cromatograma de CLAR. Reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico del PMN-B con mayor cantidad de enzima. Columna Agilent Zorbax para carbohidratos, fase móvil acetonitrilo-agua (75:25), flujo 0.8 mL/min.

Aparentemente, el PMN-B es más rápidamente hidrolizado por la enzima, a las 3 horas de reacción se genera un compuesto mientras que con el pericarpio PMN-A, el compuesto es generado hasta las 6 horas de reacción bajo las mismas condiciones. También presenta mayor generación de monómeros. Lo anterior sugiere que el PMN-B proviene de un proceso de nixtamalización más severo, es decir, es un pericarpio más procesado que el PMN-A.

5.1.3.2 Obtención y Purificación de Oligosacárido.

Se realizó una reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico del pericarpio PMN-A catalizada por la enzima Veron 191. El tiempo de reacción fue de 12 horas. El compuesto obtenido se sometió a un tratamiento de purificación con etanol frío para precipitar los compuestos de alto peso molecular y se pasó a través de una columna cromatográfica de gel de sílice. El rendimiento del producto obtenido fue de 67% respecto al sustrato utilizado en la reacción. En la figura 5.10 se muestra una placa cromatográfica donde se aprecia la formación del producto de mayor polaridad que la xilosa.

Condiciones de reacción: 1.1 U/mL, 40 °C, pH 5.4, sustrato 2%

Fase estacionaria: Sílica gel

Fase móvil: Acetato de etilo – acetona – agua (2:5:1 v/v)

Revelador: α -naftol en etanol, H_2SO_4 y agua (8:1:1 v/v)

1. Arabinosa.
2. Celobiosa.
3. Reacción a los 0 minutos.
4. Producto de la reacción a 12 horas con tratamiento de purificación con etanol frío.
5. Producto de la reacción a 12 horas con tratamiento de purificación con etanol frío después del pasó a través de la columna.
6. Xilosa.
7. Glucosa

Punto de aplicación →

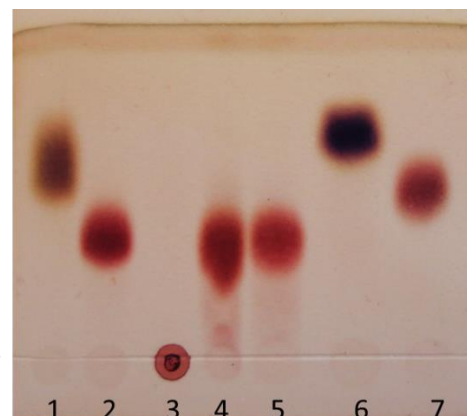


Figura 5.10 Placa cromatográfica de la reacción enzimática de la hemicelulosa proveniente del tratamiento autohidrolítico con la enzima Veron 191.

El Rf del producto obtenido fue de 0.29, éste es diferente a los Rf de los estándares de monosacáridos (xilosa 0.58, arabinosa 0.47 y glucosa 0.41) pero es similar al Rf de celobiosa (0.29); sin embargo, en el análisis por HPLC, la celobiosa y el producto obtenido eluyeron a diferente tiempos de retención. La técnica de HPLC es más sensible que la TLC, siendo más probable que sea un disacárido de pentosas.

5.1.3.3 Caracterización Parcial del Oligosacárido Obtenido con la Enzima Veron 191.

El compuesto purificado se analizó por cromatografía de intercambio iónico. El cromatograma del compuesto y una mezcla de estándares de XOS (GP 2, 3 y 4) se muestran en la Figura 5.11. Como se puede apreciar, los resultados del perfil de elución sugieren que el compuesto es un trisacárido, sin embargo en los análisis anteriores por HPLC los resultados nos indicaron que el perfil de elución correspondía a un disacárido de pentosas.

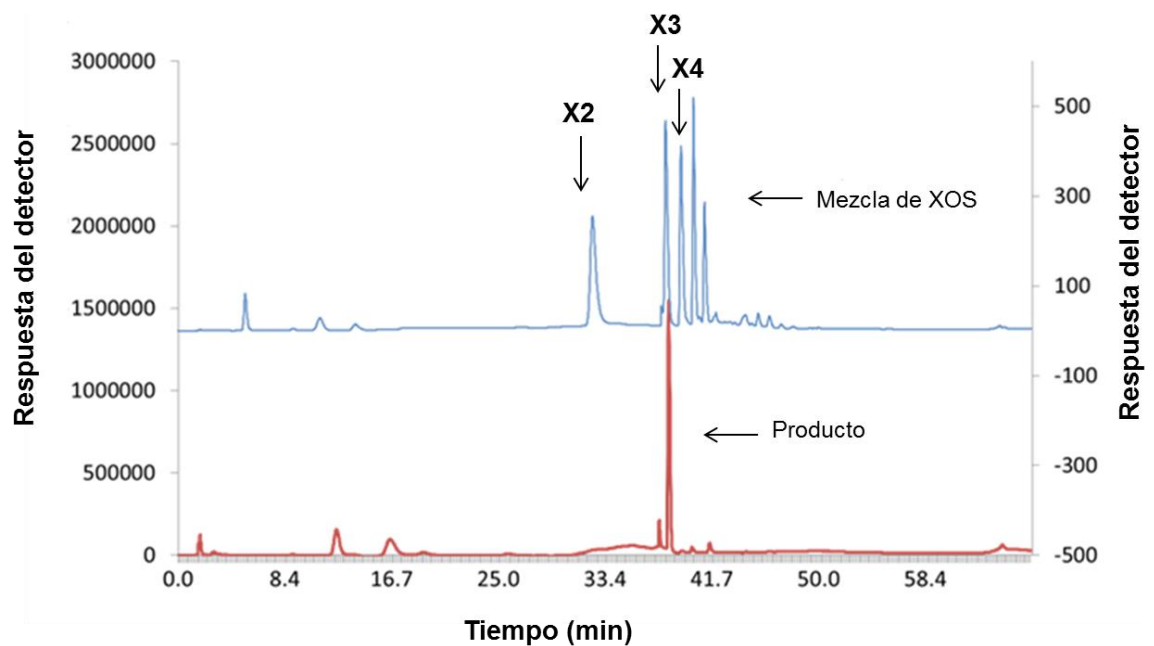


Figura 5.11 Perfil de elución de producto por medio de cromatografía de intercambio iónico. Columna CarboPac, 250 x 2 mm, fases móviles A (agua destilada), B (0.2 M NaOH), y C (NaOAc 2 M en 0.2 NaOH), flujo de 1 mL / min.

5.2 Hidrólisis Físico-química

5.2.1 Pericarpio de Maíz Nixtamalizado

Los problemas presentados en la obtención de la hemicelulosa y producción de OS por medio de la autohidrólisis en autoclave y tratamiento alcalino indicaron que era necesario un mayor conocimiento de la composición del PMN y que se requería trabajar a temperaturas más altas, lo cual se pudo lograr utilizando un reactor Parr.

Para trabajar con el reactor Parr fue necesario un mayor volumen de PMN por lo que se utilizó PMN proveniente de otro lote (PMN-C). La composición del PMN-C fue analizada, los resultados se muestran en la TABLA IX (pp. 85). El tipo de hemicelulosa del PMN es arabinoxilano, en este caso la hemicelulosa se midió en términos de xilano, arabinano y sustituyentes de grupos acetilo, lo cual representó 41.94 g/100 g de peso seco del PMN. A pesar de que el contenido de hemicelulosa en el PMN fue menor al reportado para el pericarpio de maíz intacto (49.9 g/100 g), esta cantidad fue superior al de otras materias primas lignocelulósicas de cereales y otros residuos de maíz, como las mazorcas de maíz.^{124, 141, 142}

TABLA IX
COMPOSICIÓN DEL PERICARPIO DE MAÍZ NIXTAMALIZADO PMN-C.
 (Expresado como g/100 g materia seca)

Componente	Pericarpio de maíz nixtamalizado
Celulosa	18.73 ± 0.81
Almidón	13.13 ± 1.75
Xilano	26.56 ± 0.67
Arabinano	13.01 ± 1.09
Grupos acetilo	2.37 ± 0.33
Lignina de Klason	4.67 ± 0.18
Ácidos urónicos	2.76 ± 0.33
Ácido ferúlico	0.79 ± 0.03
Ceniza	2.72 ± 0.03
Proteína	5.56 ± 0.28
Extractos	8.81 ± 0.05
Otros	0.89

Media ± DS; n=3.

La relación de Ara:Xil fue de 0.49 lo cual indica que tiene un alto grado de ramificación, y que aproximadamente por cada dos unidades de xilosa existe una unidad de arabinosa, esto dificulta los procesos de obtención a través de hidrólisis enzimáticas al no permitir un fácil acceso de las enzimas a la cadena principal del AX.¹²³ Lo cual se relaciona con los resultados obtenidos con los pericarpios PMN-A y PMN-B.

Los siguientes componentes en términos de abundancia fueron celulosa y almidón. El contenido de lignina fue relativamente bajo. El ácido ferúlico (AF) es el principal compuesto fenólico presente en el maíz, el PMN presentó 0.79%.

El contenido de ácidos orgánicos como acético y urónico, así como el ácido ferúlico, son menores a los reportados para el pericarpio de maíz intacto y para otros residuos de maíz como las mazorcas. Esto se puede atribuir al tipo de proceso del que proviene el PMN, el cual como ya se mencionó es un cocimiento a pH alcalino que provoca la saponificación de estos compuestos.

El bajo contenido de grupos acético y urónico provoca que los procesos de obtención por métodos autohidrolíticos requieran temperaturas más elevadas, debido a que estos grupos son los responsables de la actividad hidrolítica al proporcionar iones hidronio y favorecen la solubilización de la hemicelulosa en condiciones suaves. Por este motivo, no se logró obtener buenos rendimientos con el proceso de autohidrólisis en autoclave.^{86,138}

5.2.1.1 Contenido en Almidón.

El almidón se solubiliza a temperaturas por debajo de los 100 °C, si éste no es eliminado antes del proceso de autohidrólisis, los oligosacáridos obtenidos estarán acompañados de una proporción relativamente alta de productos no deseados para el objetivo del estudio, provocando que la purificación adicional de los oligosacáridos sea difícil y costosa. Por esta razón fue necesario eliminar el almidón antes de la solubilización de la hemicelulosa.¹⁴²

Para eliminar el almidón se realizó un tratamiento autohidrolítico no isotérmico hasta 130 °C. La composición del sólido después del primer tratamiento se muestra en la TABLA X (pp. 87). Se puede apreciar que el contenido de almidón casi disminuye en su totalidad y los componentes sensibles a este primer tratamiento disminuyen ligeramente en su proporción; sin embargo, aquellos que no sufren alteración se ven incrementados con respecto al PMN original.

TABLA X
COMPOSICIÓN DE LOS SÓLIDOS GASTADOS DESPUÉS DEL
PRETRATAMIENTO A 130°C
(Expresado como g/100 g materia seca)

Componente	PMN (después del primer tratamiento acuoso a 130°C)
Celulosa/ β-Glucano	23.89 \pm 0.08
Almidón	0.77 \pm 0.00
Xilano	29.57 \pm 0.13
Arabinano	13.40 \pm 0.17
Grupos acetilo	0.45 \pm 0.08
Lignina de Klason	8.50 \pm 0.03
Ácidos urónicos	4.20 \pm 0.49
Ácido ferúlico	0.92 \pm 0.01
Ceniza	2.93 \pm 0.02
Proteína	4.50 \pm 0.27
Extractos	3.22 \pm 0.21
Otros	7.65

Media \pm SD; n=3.

5.2.2 Evaluación de RLS sobre la Solubilización de la Hemicelulosa por Procesos Autohidrolíticos no Isotérmicos

La hidrólisis de los materiales lignocelulósicos es un proceso complejo. Entre los factores que influyen en la cinética del proceso se encuentran el tamaño de partícula, la relación líquido-sólido, la temperatura y el tiempo de reacción.⁹¹ En el presente trabajo, se evaluaron las RLS 8:1, 10:1 y 12:1 g de agua / g de materia seca a diferentes temperaturas.

En los procesos autohidrolíticos no isotérmicos, el tiempo de reacción es variable, debido a que es determinado por el tiempo necesario para alcanzar la temperatura deseada. Para conocer el período de tiempo requerido para alcanzar las temperaturas contempladas en el presente trabajo y poder calcular los factores de severidad de los procesos autohidrolíticos se realizó el perfil de temperatura de los mismos contra el tiempo, el cual se muestra en la Figura 5.12

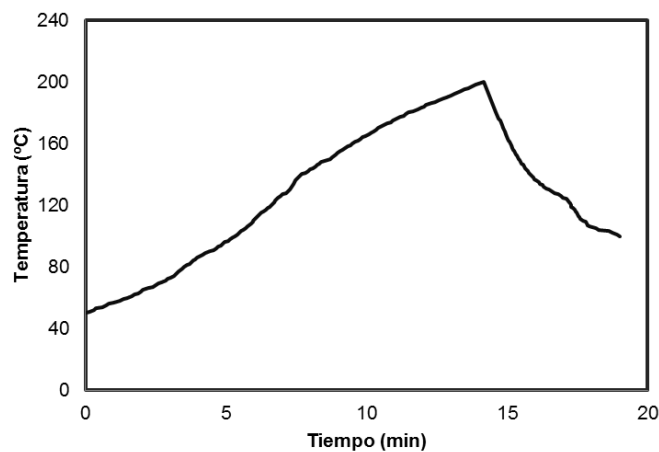


Figura 5.12 Perfil de temperatura de los procesos autohidrolíticos.

El perfil indica que las temperaturas del proceso de autohidrólisis evaluadas se alcanzan en un período corto de tiempo, el cual es menor a 15 minutos.

Los factores de severidad entre mayores sean causan mayor solubilización de hemicelulosa; sin embargo, durante el proceso de autohidrólisis se alcanza un punto donde además de solubilizar la hemicelulosa, los oligosacáridos liberados son hidrolizados a sus monómeros, por lo que el objetivo es buscar el mayor rendimiento de oligosacáridos en los licores de autohidrólisis con la menor cantidad de monómeros, y no la mayor solubilización de hemicelulosa durante el proceso.^{86, 92}

5.2.2.1 Generación de Oligosacáridos.

Los oligosacáridos se obtuvieron mediante la solubilización selectiva de la hemicelulosa realizada por autohidrólisis no isotérmica. La dependencia de los rendimientos de oligosacáridos, monosacáridos y productos de la degradación de azúcar para las RLS 8, 10 y 12 (p/p) se muestran en las Figuras 5.13 (pp. 90), 5.14 (pp. 91) y 5.15 (pp.92), respectivamente.

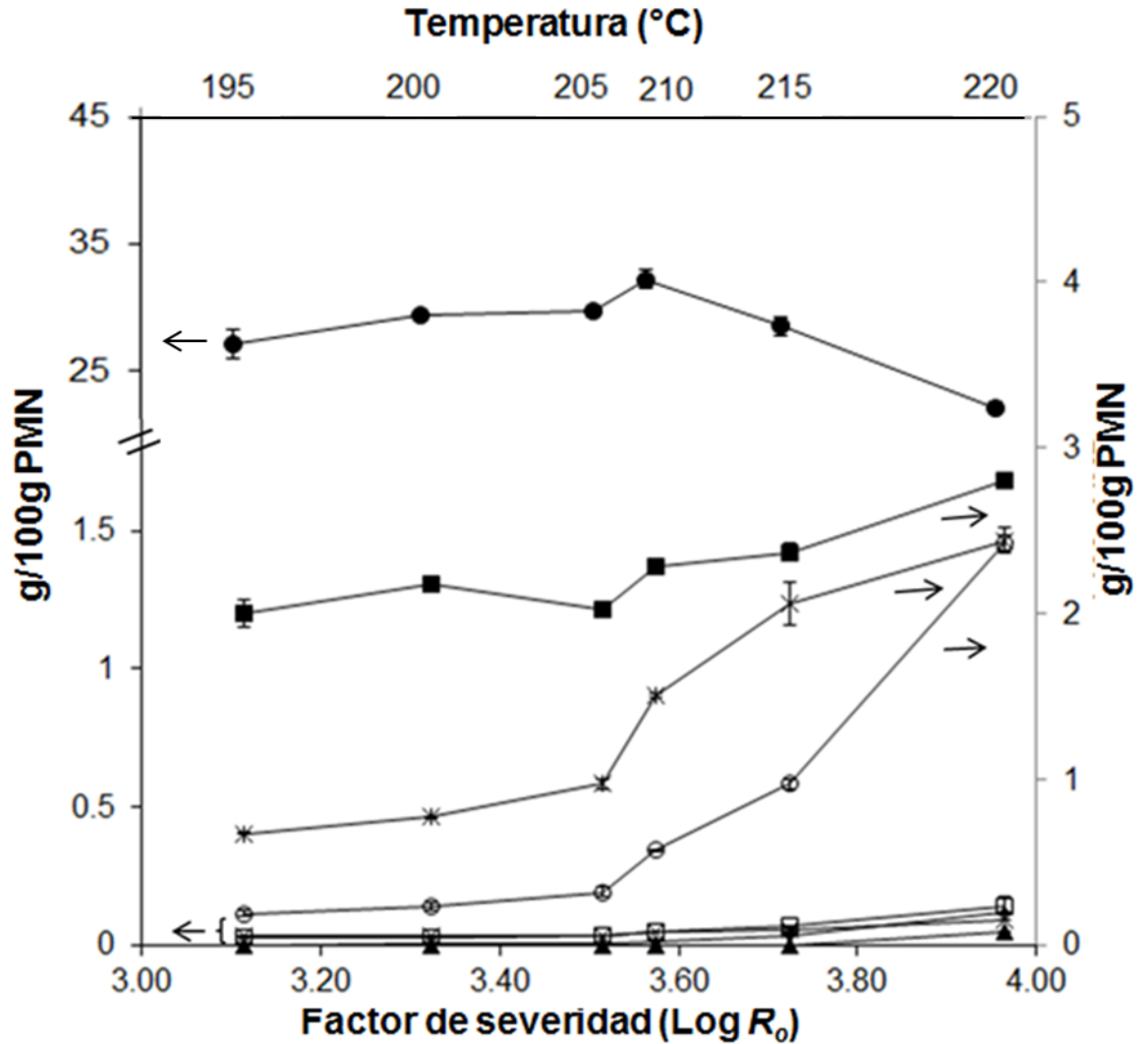


Figura 5.13 Dependencia del rendimiento de los productos de autohidrólisis no isotérmica del PMN sobre el factor de severidad con RLS 8 (p/p). ● AXOS, ■ GOS, ○ Xilosa, □ Glucosa, * Arabinosa, × Ácido acético, ▲ HMF, ◆ Furfural.

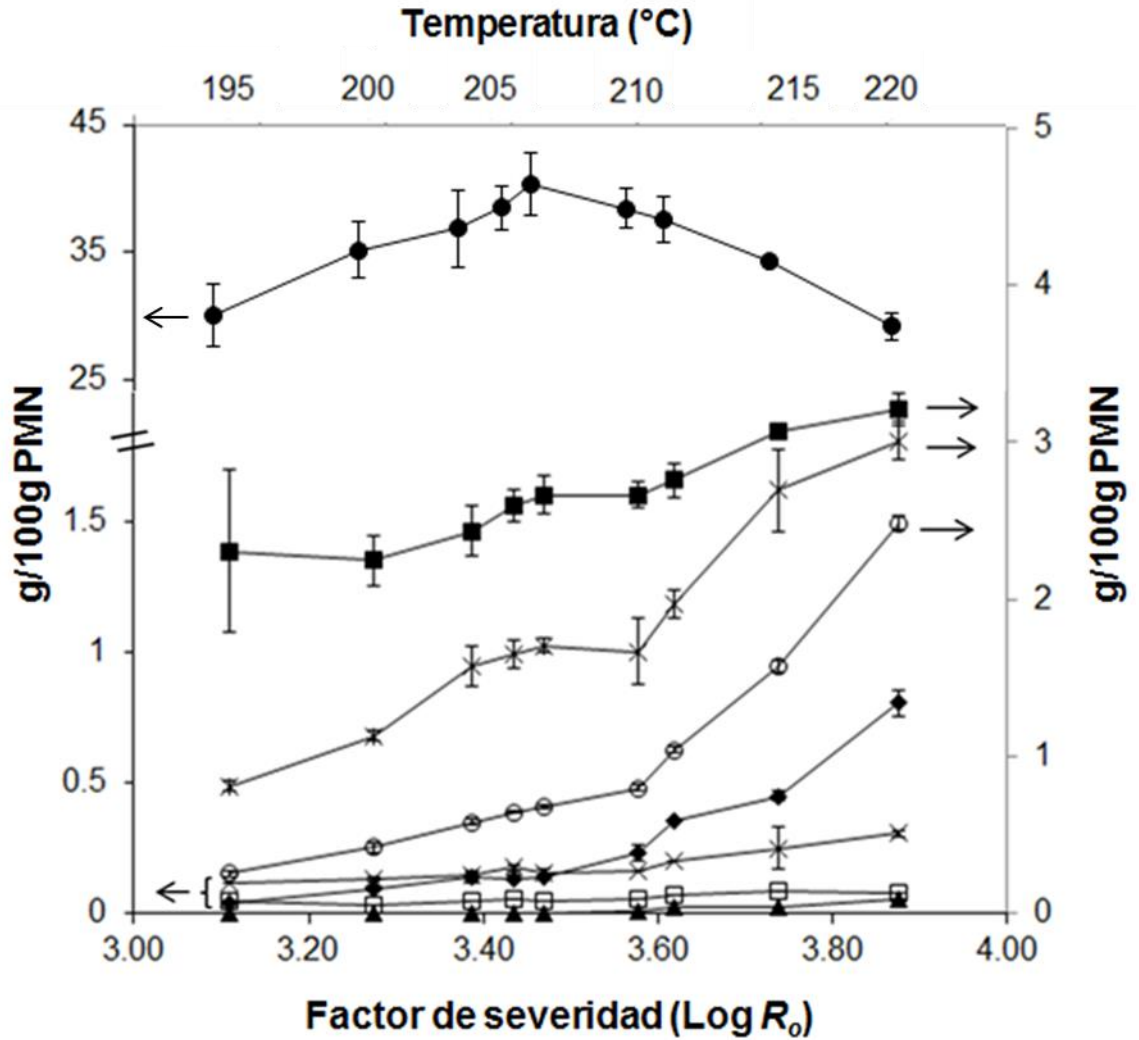


Figura 5.14 Dependencia del rendimiento de los productos de autohidrólisis no isotérmica del PMN sobre el factor de severidad con RLS 10 (p/p) ● AXOS, ■ GOS, ○ Xilosa, □ Glucosa, * Arabinosa, × Ácido acético, ▲ HMF, ◆ Furfural

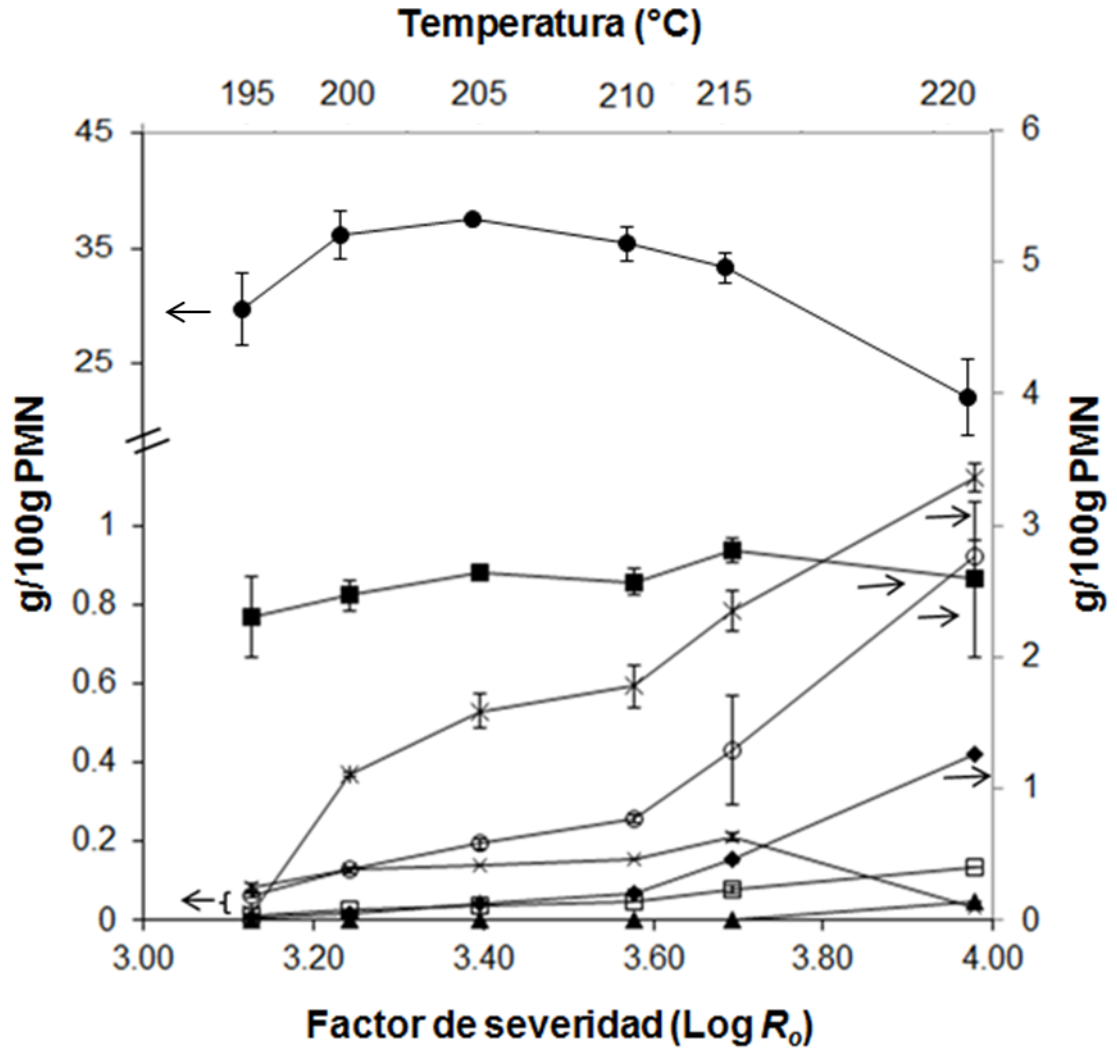


Figura 5.15 Dependencia del rendimiento de los productos de autohidrólisis no isotérmica del PMN sobre el factor de severidad con RLS 12 (p/p). ● AXOS, ■ GOS, ○ Xilosa, □ Glucosa, * Arabinosa, × Ácido acético, ▲ HMF, ◆ Furfural.

Los AXOS fueron el componente principal solubilizado en todos los tratamientos. Además de AXOS, la fracción de oligosacárido incluye una mínima proporción de GOS probablemente derivados de almidón residual, β -glucano o celulosa de bajo peso molecular presente en el PMN. El efecto de la temperatura sobre el rendimiento de solubilización de oligosacáridos mostró el mismo patrón de variación en las tres relaciones líquido-sólido consideradas. Los rendimientos de GOS no muestran diferencias estadísticas entre las RLS utilizadas ($p < 0.05$).

Los rendimientos más altos de AXOS para las RLS 8, 10 y 12 p/p se observaron a 210, 207 y 205 °C, respectivamente. Estas temperaturas son ligeramente superiores a las reportadas para otros residuos de maíz como mazorcas de maíz, esto se puede atribuir a que este residuo posee una composición diferente del PMN. Aunque la hemicelulosa es más abundante en el PMN, el contenido de los grupos acetilo y urónicos, que influyen en el proceso de autohidrólisis, es menor en comparación con la concentración reportada en las mazorcas de maíz.¹⁴¹

Los factores de severidad calculados para las temperaturas de mayor rendimiento de AXOS fueron $\log R_o = 3.58, 3.47$ y 3.40 (R_o en minutos), estos fueron inversamente proporcionales a las RLS estudiadas. Lo anterior indica que una proporción menor de agua requiere temperaturas más elevadas para obtener los máximos rendimientos. El rendimiento de AXOS con la RLS 8 p/p fue significativamente diferente de las RLS 10 y 12 p/p, mientras que en estas dos últimas RLS no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$).

Respecto a la liberación de monómeros, la generación de arabinosa fue más rápida que la xilosa por ser un sustituyente de la cadena principal de xilano. Los productos de degradación de monosacáridos, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), fueron producidas en cantidades mínimas. Mientras que la concentración de HMF fue insignificante, la generación de furfural aumentó con la temperatura y RLS utilizada. La generación de estos productos no fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$), excepto para la generación de furfural entre RLS 8 y 12 p/p.

Las concentraciones limitadas de monosacáridos y la alta concentración de AXOS siguieron un alto grado de conversión del arabinoxilano en los compuestos deseados lo que confirma la idoneidad de las condiciones operativas de autohidrólisis. El rendimiento fue mayor que reportes de otros residuos de maíz, como mazorcas de maíz utilizando autohidrólisis, probablemente porque el PMN contiene más hemicelulosa para ser transformado AXOS, y menos lignina que puede obstruir la separación de las cadenas de hemicelulosa de la matriz de la pared celular.¹⁴¹

5.2.2.2 Contenido Fenólico.

Con el fin de evaluar la presencia de AF en los licores de autohidrólisis se determinó el contenido fenólico solo para las RLS 8 y 10, debido a que entre las RLS 10 y 12 no existe diferencia significativa en el rendimiento de AXOS.

El contenido fenólico se midió en los licores de autohidrólisis, además se realizaron extracciones líquido-líquido con acetato de etilo y se determinó el contenido de fenoles en los extractos. Los resultados se muestran en la TABLA XI (pp. 95).

TABLA XI
RENDIMIENTO DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y COMPUESTOS SOLUBLES
EN ACETATO DE ETILO EN LOS PROCESOS AUTOHIDROLÍTICOS NO
ISOTÉRMICOS CON RLS 8 Y 10 (p/p).

T (°C) / Factor de severidad (Log R_0)	Hidrolizado		Extractos procesados	
	CF (g GAE/100 g PMN)	SSAE (g extracto / 100 g PMN)	FSAE (g GAE / 100 g PMN)	CFE (g GAE / g extracto)
RLS 8 (g/g)				
195 / 3.12	1.01 ± 0.04*	0.36 ± 0.01	0.04 ± 0.00*	0.10 ± 0.05
200 / 3.32	1.01 ± 0.01*	0.33 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.23 ± 0.05
205 / 3.52	1.25 ± 0.01	0.39 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.24 ± 0.02
210 / 3.58	1.63 ± 0.08	0.49 ± 0.04	0.13 ± 0.01	0.26 ± 0.09
215 / 3.73	1.88 ± 0.01*	0.65 ± 0.01	0.16 ± 0.02*	0.25 ± 0.05
220 / 3.96	2.25 ± 0.05*	1.50 ± 0.00	0.34 ± 0.02*	0.22 ± 0.08
RLS 10 (g/g)				
200 / 3.27	1.44 ± 0.01*	0.41 ± 0.01	0.16 ± 0.01*	0.388 ± 0.02
203 / 3.39	1.59 ± 0.02	0.46 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0.323 ± 0.02
205 / 3.44	1.64 ± 0.05	0.50 ± 0.02	0.23 ± 0.01	0.451 ± 0.06
207 / 3.47	1.77 ± 0.05*	0.55 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.337 ± 0.06
210 / 3.58	1.93 ± 0.08	0.68 ± 0.01	0.21 ± 0.01*	0.310 ± 0.06
212 / 3.62	2.03 ± 0.04*	0.84 ± 0.04	0.26 ± 0.00	0.332 ± 0.08
220 / 3.74	2.66 ± 0.03*	1.14 ± 0.02	0.75 ± 0.01*	0.320 ± 0.06

Media ± DS; (*) Diferencia significativa ($p < 0.05$); n=3.

CF. Compuestos fenólicos

SSAE. Sólidos solubles en acetato de etilo

FSAE. Fenoles Solubles en acetato de etilo

CFE. Compuestos fenólicos en el extracto

Como se puede observar, independiente de la RLS utilizada, la solubilización de compuestos fenólicos (CF y FSAE) en licores de autohidrólisis aumentó con la temperatura.

Los fenoles presentes en los licores de autohidrólisis podrían estar libres o unidos covalentemente a azúcares.¹⁴³ La solubilización en disolventes orgánicos depende del tamaño de la cadena de azúcar.^{143,144} La recuperación de compuestos fenólicos en los extractos (FSAE) fue de aproximadamente 5-15 %, lo que indica que el resto se encuentra unido a azúcares de alto peso molecular que no tienen afinidad con el acetato de etilo y que la autohidrólisis también resultó en la liberación de compuestos no fenólicos solubles en acetato de etilo.¹²⁰ El rendimiento de SSAE fue limitado para los experimentos a temperaturas en el rango de 195-215 °C, y aumentaron notablemente en el experimento llevado a cabo a 220 °C hasta llegar a 1.5 g/100 g de PMN para RLS 8 y 1.1 g/100 g de PMN para RLS 10; sin embargo, estos resultados no presentaron diferencias estadísticas.

La relación entre los compuestos fenólicos con el extracto de acetato de etilo (CFE) se mantuvo constante, lo que indica que a temperaturas más altas hay una mayor extracción de compuestos fenólicos porque hay mayor liberación de estos en el medio de reacción.

5.2.2.3 Actividad Antioxidante.

Por otra parte, se determinó la actividad antioxidante de los licores de autohidrólisis y de los extractos de acetato de etilo utilizando diferentes métodos. La Figura 5.16 (pp. 97) muestra las actividades medidas por TEAC (Fig. 5.16 A), Poder Reductor (Fig. 5.16 B) y FRAP (Fig. 5.16 C).

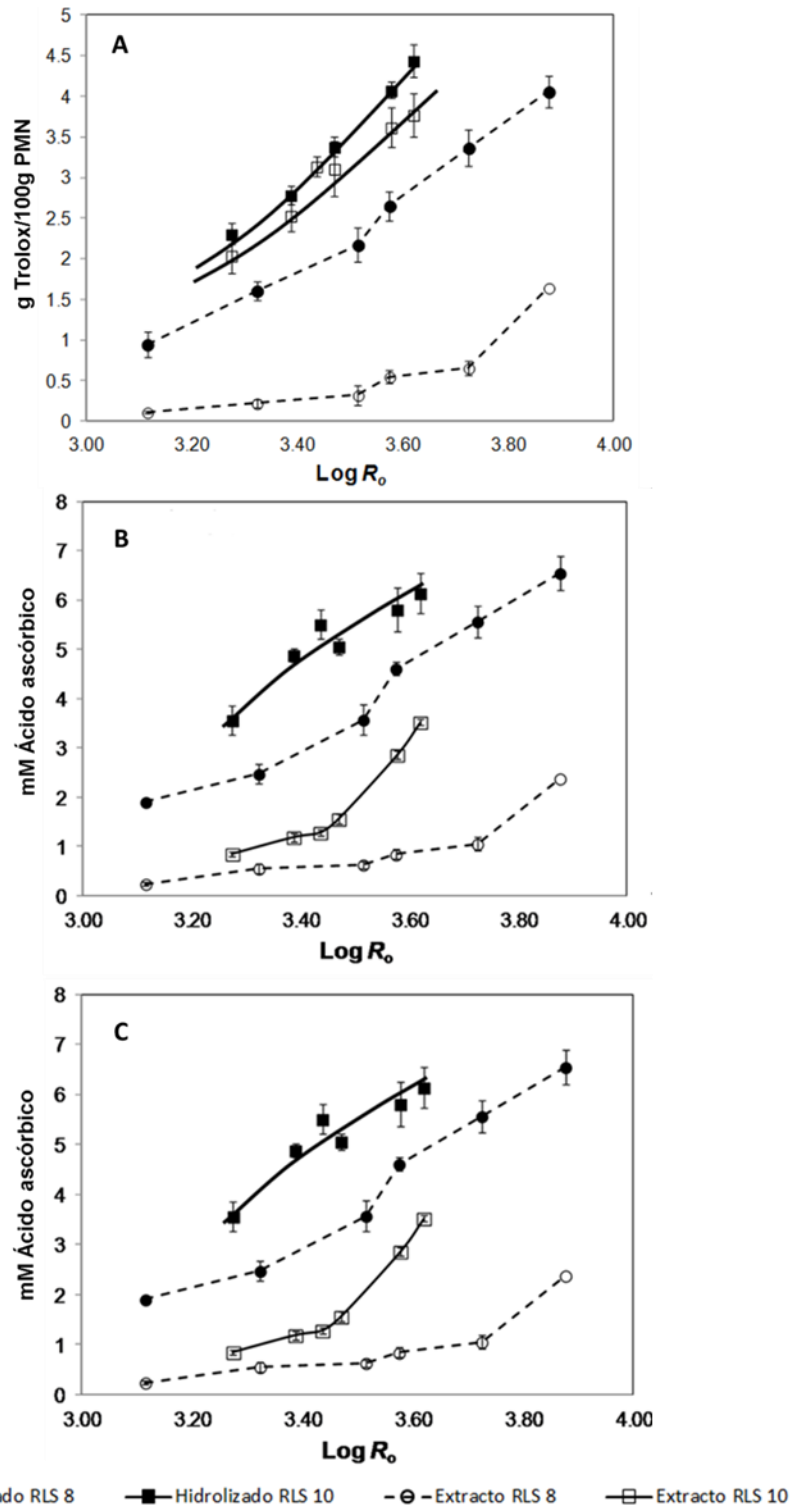


Figura 5.16 Comparación de las actividades antioxidantes de los licores de autohidrólisis y extractos de acetato de etilo. A. TEAC. B. Poder reductor. C. FRAP.

El análisis estadístico indica que la capacidad antioxidante fue significativamente diferente entre las RLS 8 y 10 (p/p) de los licores de autohidrólisis, pero no lo fueron para sus respectivos extractos. En general, la actividad antioxidante de los licores autohidrólisis aumentó notablemente con la severidad del tratamiento lo cual es comprensible debido a que a temperaturas más elevadas se observa una mayor liberación de los compuestos en el medio de reacción que pueden ser activos.¹⁴³ Las máximas actividades antioxidantes obtenidas para los licores de RLS 8 fueron 3.77 g Trolox/100 g PMN, 9.10 mM EAA y 6.55 mM EAA para TEAC, poder reductor y FRAP, respectivamente. Las actividades más altas obtenidas para la RLS 10 fueron 4.44 g Trolox/100 g PMN, 7.10 mM EAA y 6.14 mM EAA para TEAC, poder reductor y FRAP, respectivamente.

Además, se puede apreciar que la actividad antioxidante de los licores fue mayor que la de los extractos, lo cual era esperado debido a que los resultados obtenidos anteriormente indicaban que parte de ácido ferúlico permanecía enlazado a otras moléculas como los AXOS, y sólo una parte se puede extraer con acetato de etilo. Los compuestos fenólicos son los principales compuestos con actividad antioxidante presente en los cereales, pero no son los únicos, los oligosacáridos también pueden contribuir a la actividad, lo cual se mostró con los resultados obtenidos a través de los ensayos de FRAP y poder reductor, donde el mecanismo de acción antioxidante que se evalúa se da por la donación de un átomo de hidrógeno, el cual es posible con los extremos reductores de los oligosacáridos del medio.^{42, 43, 143} Por lo tanto, en el licor de autohidrólisis están presentes más compuestos que pueden actuar en sinergia y por diferentes mecanismos y presentar actividad antioxidante.¹⁴³ Los valores máximos de las actividades antioxidantes de los extractos por los ensayos de poder reductor y FRAP fueron 3.12 mM EAA y 2.38 mM EAA para RLS 8, respectivamente y 3.70 mM EAA y 3.52 mM EAA para RLS 10, respectivamente. Estos resultados fueron mayores que los reportados para

BHT, pero inferiores a BHA, (0.60 y 9.20 mM de ácido ascórbico, respectivamente).¹²⁰

Los valores de TEAC de los extractos de acetato de etilo para la RLS 8 fueron ligeramente inferiores que los valores reportados para la RLS 10 y para antioxidantes sintéticos, tales como, BHA (Butilhidroxianisol), el BHT (butilhidroxitolueno) y ácido gálico (1.80, 2.06 y 4.93 g de Trolox / g de extracto, respectivamente).¹²⁰ Los valores máximos fueron 1.64 g Trolox/ g de extracto para RLS 8 y 3.77 g Trolox / g de extracto para RLS 10, estos resultados fueron superiores a los reportados en otro residuo agroindustrial, las cáscaras de cebada (1.11 g Trolox / g de extracto).¹²⁴

El ensayo de DFPH sólo se determinó en los extractos de acetato de etilo, debido a la solubilidad de los reactivos. Los valores de EC_{50} de DFPH para los extractos de acetato de etilo se muestran en la Figura 5.17.

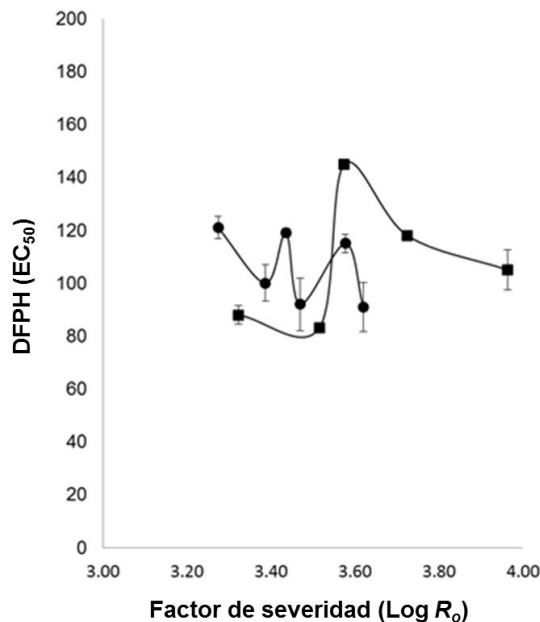


Figura 5.17 Dependencia de la EC_{50} sobre el factor de severidad de los tratamientos autohidrolíticos. ■ RLS 8 (p/p) ● RLS 10 (p/p)

Los valores para la RLS 8 alcanzaron un rango de 80-150 mg/L mientras que para la RLS 10 el rango fue de 90-120 mg/L. Los resultados de la capacidad de eliminación de radicales libres DFPH son difíciles de comparar con datos de la literatura ya que el volumen y la concentración del DFPH empleado en el ensayo pueden ser diferentes.¹³⁹ Como se puede observar, los resultados obtenidos indican que las muestras presentan una mayor capacidad de eliminación de radicales libres que el BHT y BHA, que son 279 y 240 mg/L, respectivamente, pero presentan menor actividad que lo reportado para el ácido gálico que es 34 mg/L.¹²⁰ Los valores de EC_{50} de DFPH considerados con una buena actividad antioxidante son iguales o menores a 200 mg/L.^{139, 144}

El patrón de variación sugiere una participación simultánea de reacciones que resultan en la pérdida de actividad, junto con la generación de nuevos compuestos activos en los tratamientos a temperatura diferentes.¹⁴⁴

A pesar de que el PMN contiene poco ácido ferúlico, los resultados fueron similares a los descritos para otros materiales lignocelulósicos como mazorcas de maíz, cáscaras de almendra, castañas, y cebada.¹²⁰

La RLS que mostró mejores resultados en cuanto a contenido fenólico y actividad antioxidante fue la de 10 (p/p), por lo que fue con la que se realizó la siguiente parte experimental.

5.2.2.4 Evaluación de Oligosacáridos Ferulados.

Con la finalidad de evaluar la presencia de AXOS ferulados se realizaron hidrólisis alcalinas a los licores de autohidrólisis de la RLS 10 (p/p) de las diferentes temperaturas, los resultados obtenidos se muestran en la TABLA XII (pp. 101). El AF fue encontrado principalmente unido a los AXOS. Los rendimientos de ferulato esterificado se incrementaron con la temperatura, pero no fueron significativamente diferentes ($p < 0.05$).

TABLA XII
AXOS, ÁCIDO FERÚLICO LIBRE Y FERULATO ESTERIFICADO
 (g/100 g materia seca)

Temperatura (°C)	Factor de severidad Log R_o (min)	AXOS (g / 100 g PMN)	Ácido ferúlico libre (g / 100 g PMN)	Ferulato esterificado (g / 100 g PMN)
200	3.27	34.68 ± 2.13 ^a	0.025 ± 0.002	0.542 ± 0.058 ^a
203	3.39	36.30 ± 2.88 ^a	0.015 ± 0.002	0.596 ± 0.015
205	3.44	37.85 ± 1.64 ^b	0.011 ± 0.001	0.681 ± 0.061
207	3.47	39.60 ± 2.38 ^b	0.017 ± 0.002	0.712 ± 0.083
210	3.58	37.79 ± 1.46 ^b	0.025 ± 0.001	0.720 ± 0.008 ^a
212	3.62	37.03 ± 1.71 ^a	0.036 ± 0.001	0.606 ± 0.069

Letras minúsculas en superíndices indican diferencias significativas ($p > 0.05$), media ± DS, $n = 3$.

Altas concentraciones de ácido ferúlico se localizan en salvados de cereales, dentro de los cuales el salvado de maíz es el que presenta mayor proporción.⁴³ El análisis por HPLC de la fracción soluble en acetato de etilo mostró que el AF (53%) es el compuesto fenólico más abundante seguido por ácido *p*-cumárico (25%) y vainillina (22%).

Como se mencionó con anterioridad, el proceso de nixtamalización hidroliza los enlaces ésteres que unen al ácido ferúlico con la cadena principal del AX. Por esta razón, los procesos de nixtamalización generan licores (nejayote) con alto contenido de ácido ferúlico¹⁴⁵; sin embargo, a pesar de la pérdida de éste, los resultados del contenido fenólico del PMN, así como las hidrólisis alcalinas corroboran la presencia de AXOS ferulados en los licores de autohidrólisis.

La proporción de ácido ferúlico presente en el PMN es baja, pero a la temperatura de mayor rendimiento de AXOS (207°C), el 77% del ácido ferúlico presente permaneció unido a los oligosacáridos. Estos resultados fueron superiores a los observados para autohidrólisis asistida por microondas de salvado de maíz, en el que 58.0-62.8% del ácido ferúlico inicial apareció como ferulato esterificado.⁷⁹

5.2.2.5 Análisis de los Sólidos después de la Autohidrólisis.

Con la objetivo de tener mayor información acerca del proceso autohidrolítico, se analizaron los sólidos después de los tratamientos con la RLS 10 a las diferentes temperaturas. Los resultados se muestran en la TABLA XIII.

La solubilización de hemicelulosa fue el principal efecto observado, lo que resulta en una reducción de peso de la fase sólida. La proporción de componentes de hemicelulosa (xilano, arabinano y grupos acetilo) en los sólidos gastados disminuyó con la temperatura. La celulosa y la lignina se enriquecieron en los sólidos gastados indicando una solubilización selectiva de hemicelulosa.

TABLA XIII

COMPOSICIÓN DE LOS SÓLIDOS GASTADOS OBTENIDOS A PARTIR DE LA AUTOHIDRÓLISIS DEL PMN PRETRATADO CON LA RLS10 (p/p)
(Expresado como g/100 g material seca)

Temperatura	Factor de severidad	Celulosa	Xilano	Arabinano	Grupos acetilo	Lignina de Klason
195	3.11	37.5 ± 0.62	17.8 ± 0.19	7.3 ± 0.27	0.3 ± 0.02	10.7 ± 0.08
200	3.27	43.1 ± 0.51	13.1 ± 0.06	4.3 ± 0.05	0.5 ± 0.07	13.1 ± 0.70
203	3.39	51.0 ± 1.13	11.7 ± 0.12	3.3 ± 0.07	0.4 ± 0.08	14.9 ± 0.70
205	3.44	53.4 ± 0.98	10.0 ± 0.10	2.5 ± 0.03	0.3 ± 0.05	14.7 ± 0.49
207	3.47	54.7 ± 0.66	9.7 ± 0.08	2.3 ± 0.11	0.4 ± 0.09	15.2 ± 0.49
210	3.58	53.3 ± 0.10	6.8 ± 0.09	1.3 ± 0.03	0.2 ± 0.05	15.7 ± 0.87
212	3.62	55.8 ± 0.21	5.5 ± 0.07	0.8 ± 0.05	0.1 ± 0.02	16.0 ± 0.27
215	3.74	57.1 ± 0.46	5.3 ± 0.14	0.7 ± 0.05	0.1 ± 0.00	16.8 ± 0.28
220	3.88	57.9 ± 0.44	4.3 ± 0.05	0.5 ± 0.02	0.1 ± 0.01	18.3 ± 0.39

Media ± DS; n=3.

La temperatura óptima seleccionada fue 207°C con la cual se realizaron diferentes tratamientos para un mayor volumen de licor y se mezclaron para tener una composición homogénea. La mitad de los licores se sometieron a proceso de purificación mediante tecnología de membranas y la otra parte de los licores se le realizó un tratamiento para disminuir el GP.

5.2.3 Hidrólisis Enzimática de los Oligosacáridos Presentes en los Licores de Autohidrólisis

Los licores de autohidrólisis se trataron con enzimas endoxilanasas para disminuir el GP; sin embargo, los AXOS presentes en los licores presentaban un alto grado de ramificación que impedía actuar a las enzimas.

5.2.3.1 Prehidrólisis.

Con el fin de solubilizar las cadenas de AXOS obtenidos y permitir mejor acceso a las enzimas se realizó una prehidrólisis con H₂SO₄ 0.5% a 105 y 120 °C. Se cuantificó la liberación de monómeros para evaluar la severidad del tratamiento, los resultados se muestran en la TABLA IX (pp. 104). Como se puede observar, el incremento en el tiempo de proceso es directamente proporcional al incremento de monosacáridos, sin embargo estos no son deseados. La hidrólisis a 120°C resultó ser demasiado severa por lo que se decidió no utilizar esta condición. Las condiciones utilizadas para la prehidrólisis fueron a temperatura de 105 °C por 2 minutos, estas condiciones demostraron la generación de una menor cantidad de monómeros.

Los licores después de la prehidrólisis se sometieron a un proceso de diafiltración mediante tecnología de membrana para disminuir los monómeros generados.

TABLA IX

MONOSACÁRIDOS LIBERADOS POR EL PROCESO DE PREHIDRÓLISIS DE LOS LICORES DE AUTOHIDRÓLISIS

105°C Tiempo (min)	Monosacáridos	120°C Tiempo (min)	Monosacáridos
0	0.64	0	3.88
1	2.55	1	5.26
2	3.28	2	6.63
5	5.12	3	9.27
7	6.66	4	10.00
10	7.88	5	10.94
20	9.83		

5.2.3.2 Selección de Enzimas.

Con el objetivo de disminuir el grado de polimerización de los AXOS presentes en los licores de autohidrólisis se utilizaron enzimas de diferente especificidad de forma individual y en combinación. Las enzimas comerciales utilizadas fueron Shearzyme 2x (endoxilanasas de la familia GH-10), Pulpzyme HC (endoxilanasas de la familia GH-11) y Veron 191 (no se cuenta con reporte del tipo de endoxilanasas). El seguimiento de la reacción se realizó cuantificando la liberación de azúcares reductores. Los resultados se muestran en la Figura 5.19.A (pp. 105).

La enzima Veron 191 mostró mayor liberación de extremos reductores indicando mayor hidrólisis y por consecuencia mayor reducción del GP; sin embargo, por los resultados iniciales donde se dificultó la hidrólisis enzimática se decidió utilizar una combinación de enzimas. Los resultados se muestran en la Figura 5.19.B (pp. 105).

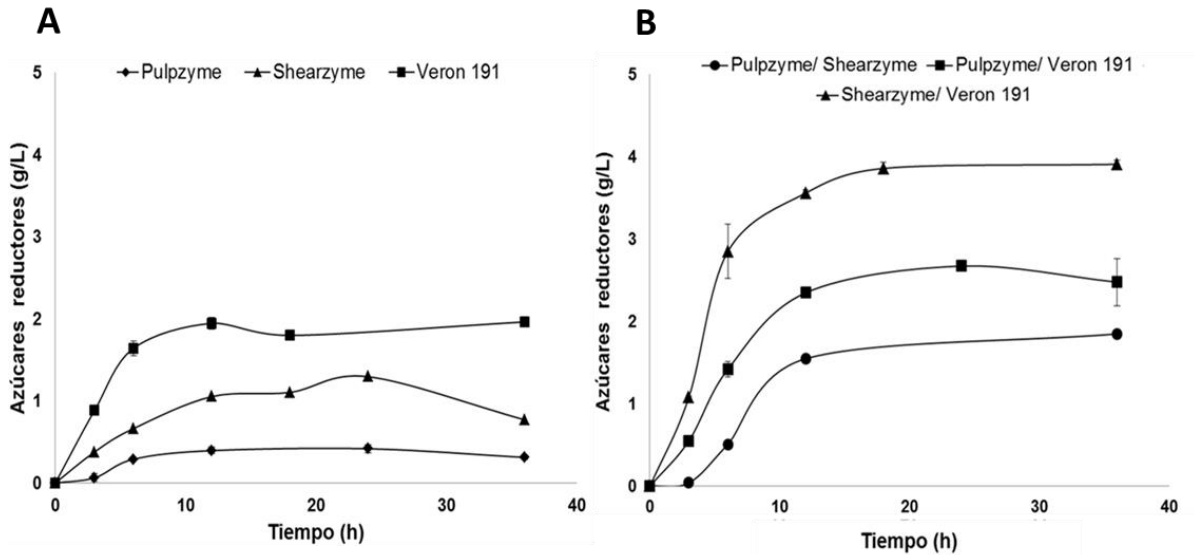


Figura 5.19 Cinética de hidrólisis enzimática de licores de autohidrólisis.

La liberación de azúcares reductores aumentó al doble con la hidrólisis de las enzimas combinadas, indicando que el GP disminuyó. Las enzimas que mostraron mayor liberación de azúcares reductores fueron aquellas que tienen la capacidad de actuar cerca de ramificaciones en la cadena del arabinosilano (familia GH-10) evidenciando la complejidad de la estructura de la hemicelulosa presente en el PMN.¹⁰⁸ Estas enzimas fueron la Shearzyme, enzima reportada como perteneciente a la familia GH-10¹⁰⁸, y la Veron 191, de la cual no existen reportes de que pertenezca a esta familia, pero los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que se trata de una endoxilanasas de la familia GH-10.

Los licores obtenidos después de la prehidrólisis y después del proceso de diafiltración fueron tratados con la combinación de enzimas seleccionadas.

5.2.4 Purificación de Oligosacáridos

Con el fin de purificar los AXOS obtenidos se utilizó la tecnología de membranas en el modo de nanofiltración. Los resultados para elegir el tipo de membrana a utilizar y la TMP a la cual se trabajó se muestran en la Figura 5.20 (pp. 107).

Como se puede observar, las tres membranas tienen recuperación de AXOS mayores al 90%; sin embargo, el dispositivo de la membrana de Amicon es empleado para manejar volúmenes pequeños, por lo que fue descartado.

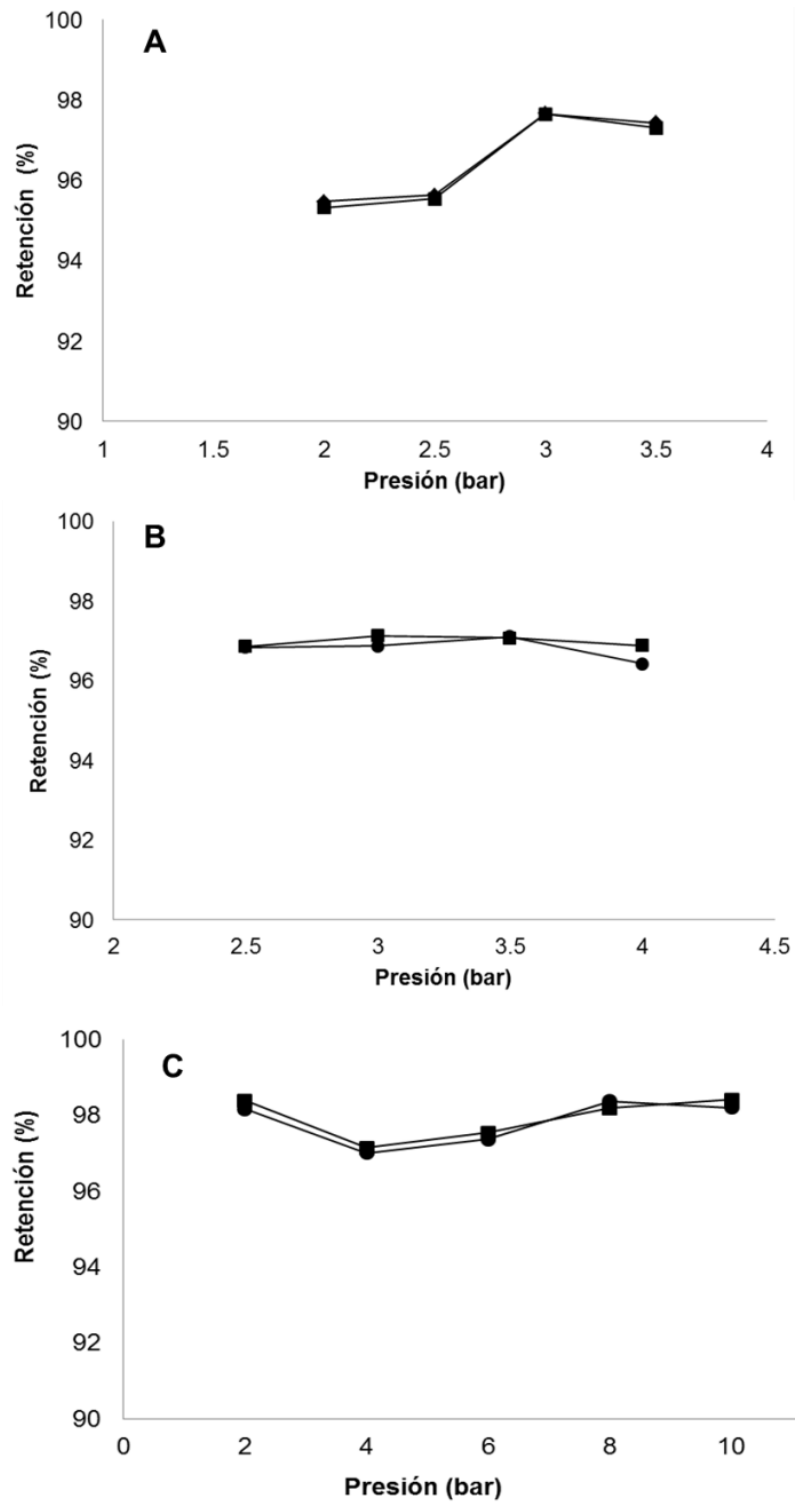


Figura 5.20 Porcentajes de retención de AXOS. A. Amicon B. Polimérica C. Cerámica.
■ AXOS. ● GOS

Entre las membranas cerámica y polimérica la diferencia se da en el ensuciamiento de la membrana. En la Figura 5.21 se muestran los porcentajes de recuperación de permeabilidad. Como se puede apreciar, más del 95% de la permeabilidad inicial de la membrana polimérica se recuperó después del lavado, mientras que la recuperación de la permeabilidad de la cerámica tras el primer lavado fue de solo el 60% del inicial.

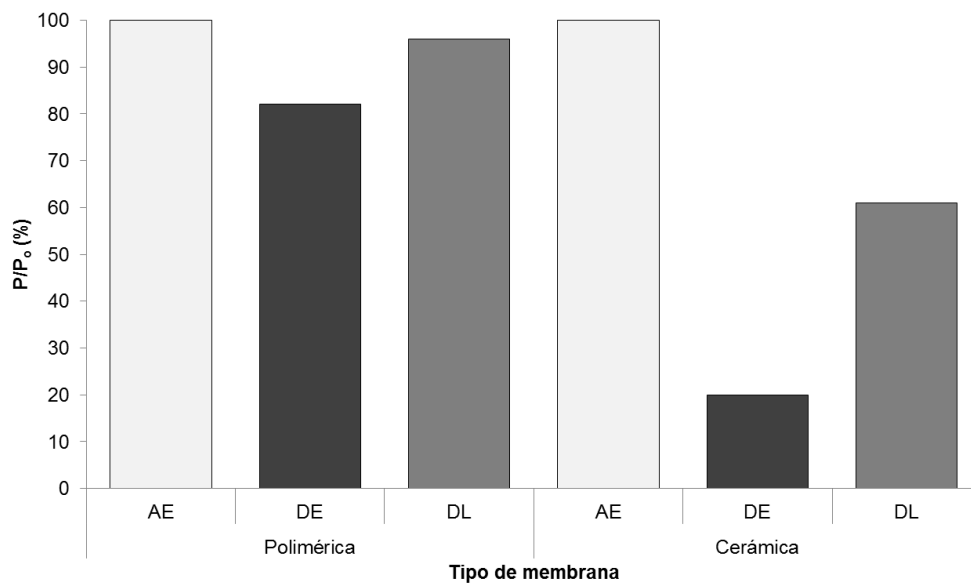


Figura 5.21. Permeabilidad relativa de las membranas.

AE. Antes del ensuciamiento. DE. Después del ensuciamiento. DL. Después del lavado.

Sobre la base de los resultados de la retención, y teniendo en cuenta las diferencias en el ensuciamiento y recuperación de la permeabilidad de las membranas, las etapas de diafiltración continua (CD) se realizaron con la membrana polimérica a una TMP de 3 bar.

La diafiltración continua de los licores de autohidrólisis se realizó hasta un VD 8 para eliminar solutos no deseados de bajo peso molecular. El esquema de obtención y purificación se muestra en la figura 5.22.

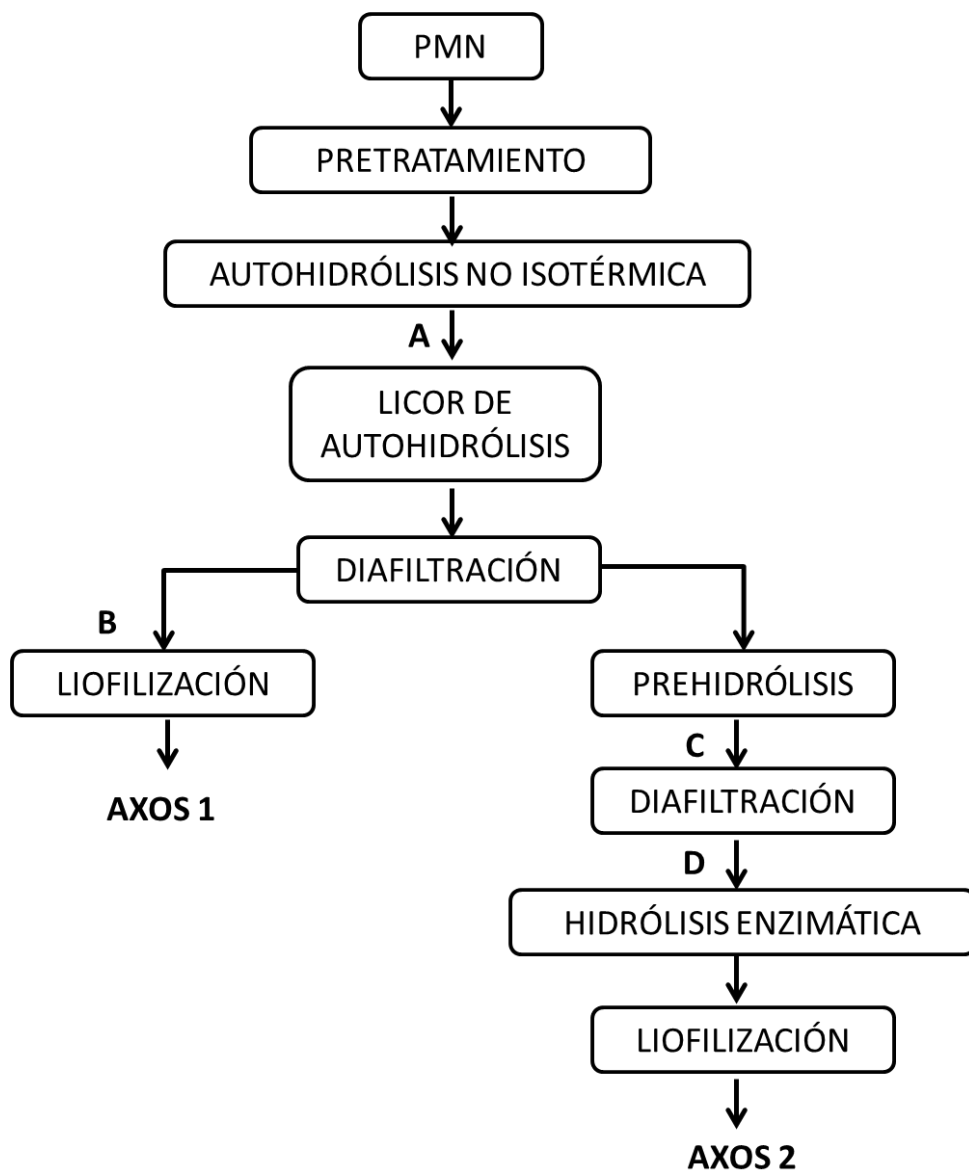


Figura 5.22 Esquema del procesamiento del pericarpio de maíz nixtamalizado para la obtención de AXOS

5.2.5 Caracterización Química de Oligosacáridos

La composición química de las diferentes fracciones indicadas en el esquema de la Figura 5.22 (pp. 109) fue analizada, los resultados se muestran en la TABLA X.

TABLA X

COMPOSICIÓN DE LAS FRACCIONES A, B, C y D DESCRITAS EN LA FIGURA 5.22. (Expresada como fracción másica g / g de licor)

Componente	A	B	C	D
AXOS	0.8749	0.8785	0.7940	0.8994
GOS	0.0373	0.0342	0.0287	0.0341
Xilosa	0.0026	0.0007	0.0268	0.0116
Arabinosa	0.0111	0.0039	0.1155	0.0524
Glucosa	0.0003	nd	0.0004	nd
Ácido ferúlico	0.0007	0.0001	0.0017	0.0011
Ferulato esterificado	0.0013	0.0013	0.0014	0.0014
Furfural	nd	nd	nd	nd
Otros compuestos no identificados	0.0731	0.0825	0.03229	0.0014

- A. Licor de autohidrólisis.
 B. Licor de autohidrólisis diafiltrado.
 C. Licor después de la prehidrólisis.
 D. Licor de prehidrólisis diafiltrado

Los AXOS fueron los principales componentes en los licores de autohidrólisis (denotados fracción A), éstos representaron 0.8749 g/g de licor. El ácido ferúlico fue detectado de forma libre en una concentración de 0.0007 g/g de licor; sin embargo, las condiciones del proceso autohidrólisis permitieron que parte del ácido ferúlico presente en el PMN permaneciera como ferulato esterificado (0.0013 g/g licor). También se encontraron concentraciones bajas de GOS y monosacáridos. Los GOS representaron 0.0373 g/g de licor, mientras que los monosacáridos totales representaron 0.014 g/g de licor. No se detectaron concentraciones de productos de degradación de los azúcares.

La composición de licores después de la diafiltración se muestra en la Tabla X y se denota fracción B (véase la Fig. 5.22). Los componentes de interés, los AXOS, se retuvieron completamente, lo que sugiere que las fracciones de estos compuestos eran de alto grado de polimerización (GP). La proporción de ferulato esterificado también se mantuvo constante. Los GOS presentaron un porcentaje de retención del 91.7% que revela que la proporción de estos compuestos (probablemente fracciones GP bajas) se perdieron en el permeado. Los componentes de bajo peso molecular presentes en el licor, como xilosa y arabinosa, mostraron porcentajes de retención de 27.7 % y 34.9%, respectivamente. La glucosa no se detectó en el licor después del proceso de diafiltración. El ácido ferúlico libre se recuperó en sólo el 14.3%. El proceso de diafiltración continua permitió la eliminación de compuestos monoméricos tales como xilosa, arabinosa y ácido ferúlico.

Por otra parte, la prehidrólisis genera monómeros a causa del rompimiento al azar de los oligómeros presentes en los licores. La composición del licor después del proceso hidrolítico se muestra en la tabla X y se denota corriente de C (ver Fig. 5.22). Los efectos del tratamiento de prehidrólisis estaban relacionados con la generación de oligómeros de menor GP. Pero este no fue el único efecto; también hubo una ligera disminución en la fracción de AXOS. Estos disminuyeron un 9.6 % y se aumentaron las concentraciones de arabinosa y xilosa. Los GOS también se redujeron en un 16 % y las concentraciones de glucosa se detectaron mínimamente. Las condiciones de prehidrólisis empleadas no generaron productos de degradación de azúcares y el ferulato esterificado tampoco resultó afectado. Sin embargo, la concentración de ácido ferúlico libre aumentó posiblemente a partir de fracciones no sacáridos presentes en una concentración mínima en el licor.

Las fracciones B y C fueron analizados por HPSEC para obtener información sobre la distribución de la masa molar de los AXOS. Los cromatogramas se muestran en la Figura 5.23 (pp. 112).

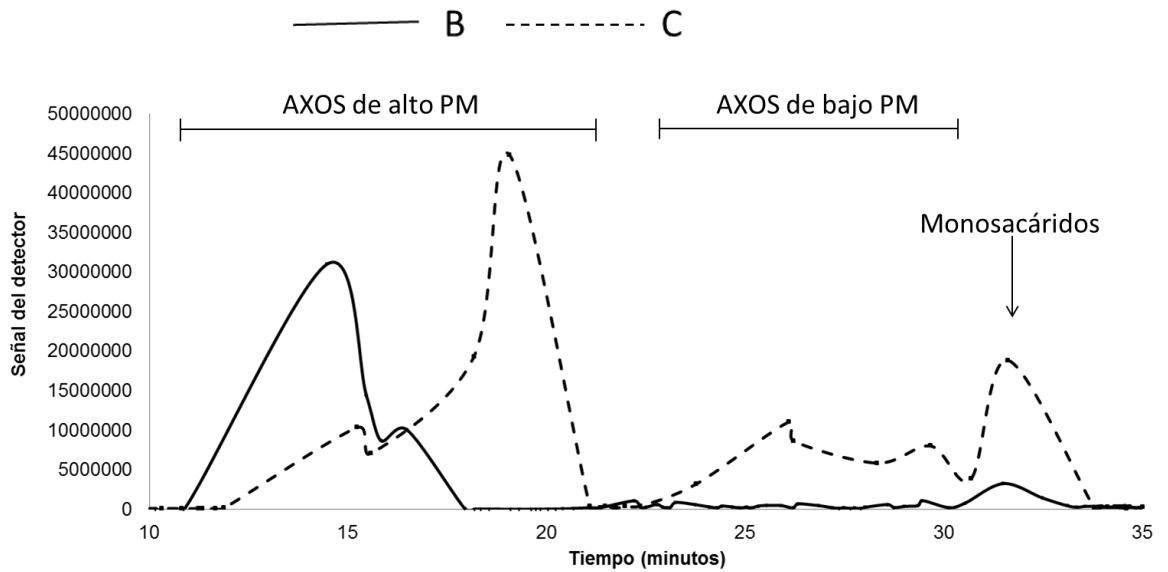


Figura 5.23 Cromatogramas de HPSEC de los AXOS obtenidos. Columna TSKgel

G3000PWXL, 300 x 7.8 mm, fase móvil agua destilada, flujo 0.6 mL / min, a 30 °C.

El perfil de elución mostró que la fracción B presenta AXOS con un alto GP y el perfil de elución de la corriente de C muestra que después del tratamiento de prehidrólisis se generan tres grupos de pesos moleculares. Dos grupos de oligómeros de menor GP que los AXOS presentes en la corriente B y uno monosacáridos. Para disminuir la concentración de monosacáridos generados y aumentar la concentración de los AXOS, la fracción C se sometió a un proceso de diafiltración continua como se describe anteriormente antes del tratamiento enzimático. La concentración de las componentes después del proceso de refinado se denota D (ver. Fig. 5.22) se muestra en la Tabla X. Las proporciones de oligosacáridos, GOS y AXOS, se concentraron en el licor. El ferulato esterificado también se mantuvo constante. Los compuestos monoméricos, xilosa, arabinosa y ácido ferúlico, se eliminaron en un 56.9%, 54.7% y 35.3%, respectivamente. La glucosa no se detectó en el licor después del proceso de diafiltración.

La fracción D posteriormente se somete a la hidrólisis enzimática para disminuir el GP, se puede suponer que la composición antes y después de la hidrólisis es esencialmente la misma en términos de constituyentes de oligosacáridos independientemente que muestren una distribución diferente del GP. Las fracciones que se liofilizaron para obtener los AXOS en polvo y realizar las pruebas biológicas fueron la fracción B y D después de la hidrólisis enzimática, la fracción B corresponde a los AXOS de mayor peso molecular (AXOS 1) y la fracción después de la hidrólisis enzimática corresponde a los AXOS que tienen un menor GP (AXOS 2).

En la tabla XI se muestran los datos del contenido de azúcares reductores y relación Ara/Xil. AXOS 2 contiene 4.2 veces más azúcares reductores que AXOS 1. Lo anterior confirma la disminución de las cadenas de oligosacáridos y por consiguiente la disminución del GP después del tratamiento enzimático al tener mayor cantidad de extremos reductores. Como se puede apreciar, los AXOS 1 son estructuralmente más complejos, presentan una relación Ara/Xil de 0.42, mientras que los AXOS 2 son ligeramente menos ramificados, la relación de Ara/Xil fue de 0.32.

TABLA XI**AZÚCARES REDUCTORES Y RELACIÓN ARA/XIL DE AXOS**

Oligosacáridos	Azúcares reductores (g/L)	Relación Ara/Xil
AXOS 1	2.38 ± 0.004	0.42
AXOS 2	10.00 ± 0.012	0.32

5.2.5.1 Caracterización Estructural de Oligosacáridos

Los AXOS obtenidos se analizaron por espectrometría de masas. Los espectros de masas de los aductos de sodio determinados para los AXOS 1 y AXOS 2 se presentan en la Figura 5.24 (pp.114) y 5.25 (pp.115), respectivamente. El análisis de los AXOS 1 y AXOS 2 indicó la presencia de una serie homóloga de las pentosas (xilosa y / o arabinosa) y reveló la existencia de oligosacáridos mono-ferulados. Los AXOS 1 presentaron GP de 5 a 22 unidades de pentosas (iones m/z 701, 833, 965, 1098, 1230, 1362, 1494, 1626, 1758, 1890, 2022, 2154, 2417, 2550, 2682, 2814 y 2946) y en cada caso se encontró la masa correspondiente a pentosas de GP 5 a 22 unida con una molécula de ácido ferúlico (iones m/z 745, 877, 1009, 1142, 1274, 1406, 1538, 1670, 1802, 1934, 2066, 2198, 2330, 2462, 2594, 2762, 2858 y 2990). La hidrólisis enzimática de los AXOS 1 se confirmó con los espectros de los AXOS 2, los cuales presentaron un GP menor con un rango de 5 a 12 unidades de pentosas (iones m/z 701, 833, 965, 1098, 1230, 1362, 1494 y 1626) además de la presencia de oligosacáridos mono-ferulados en cada caso (iones m/z 745, 877, 1009, 1142, 1274, 1406, 1538 y 1670) que corresponden a la masa de pentosas de GP de 5 a 12 unidas a una molécula de ácido ferúlico, lo cual confirma que después del proceso de hidrólisis enzimática las moléculas de ácido ferúlico se conservaron unidas a los oligosacáridos.

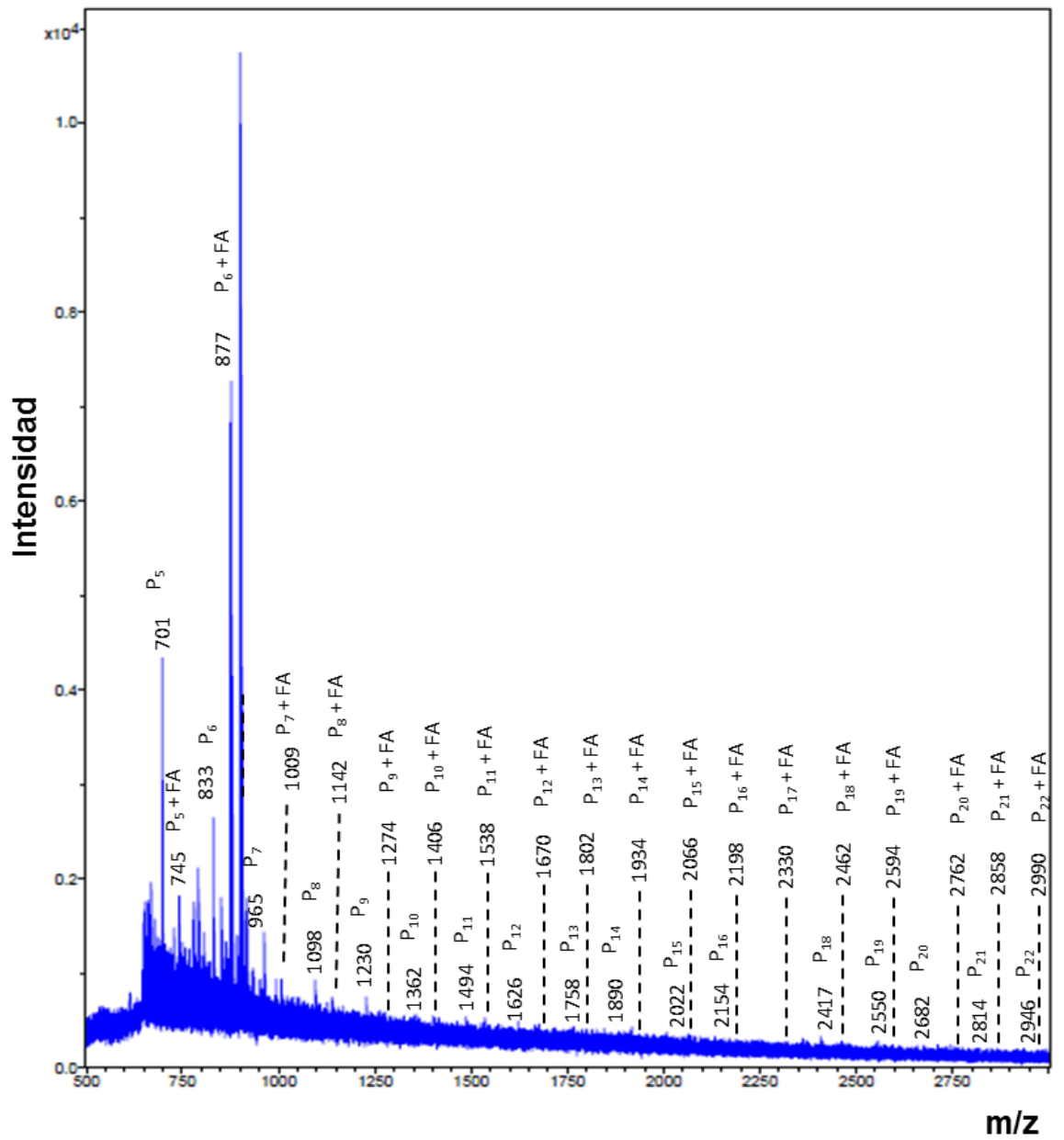


Figura 5.24 Espectro de masas de AXOS 1.

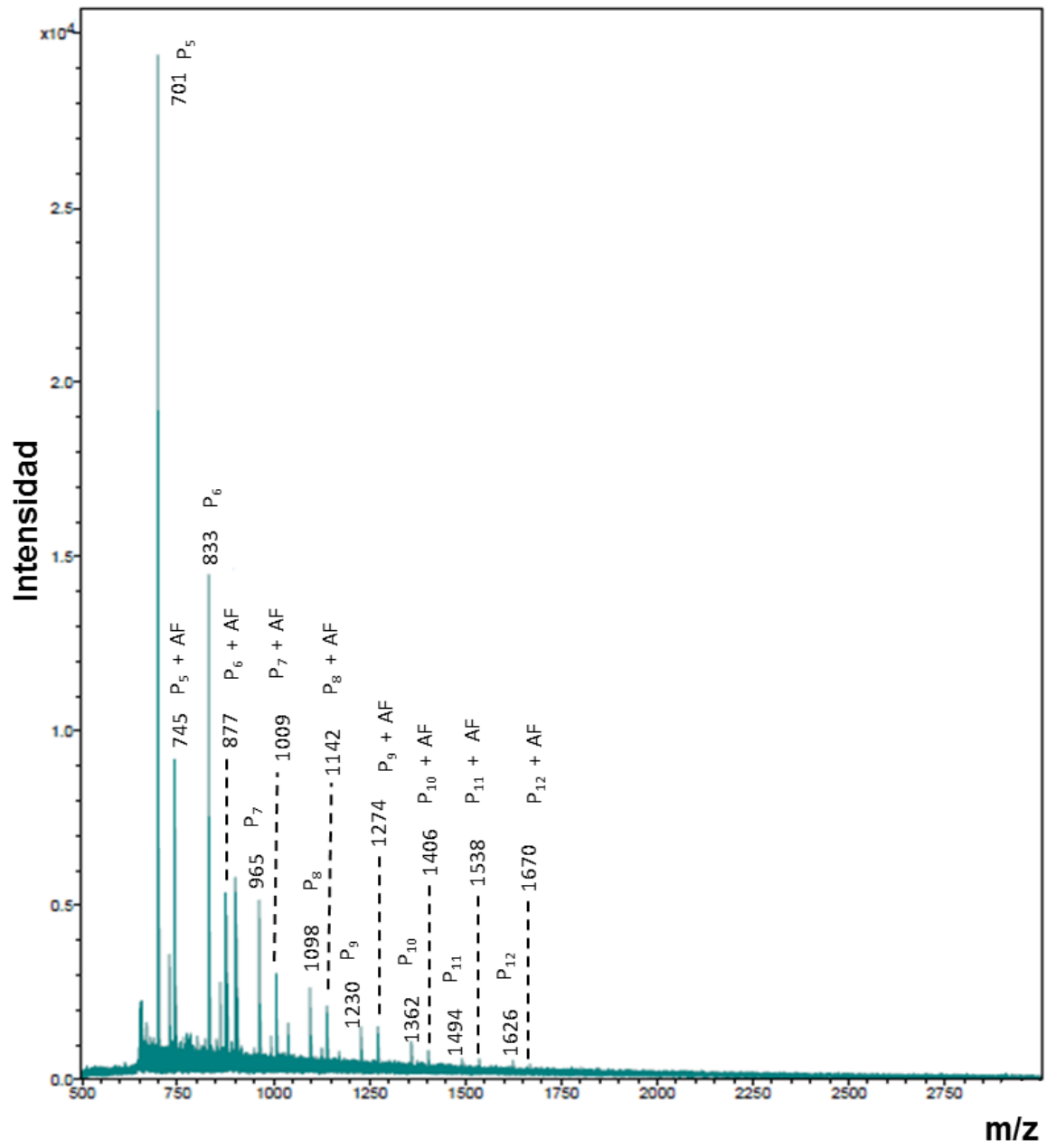


Figura 5.25 Espectro de masas de AXOS 2.

5.2.6 Evaluación de la Actividad Biológica de los Oligosacáridos.

5.2.6.1 Determinación de la Actividad Prebiótica de Oligosacáridos en Estudios *in vitro*.

La actividad prebiótica puede ser evaluada midiendo la fermentabilidad de los XOS y AXOS frente a bacterias benéficas del tracto gastrointestinal, reportando como estimulación de diferentes microorganismos beneficios o como efecto bifidogénico si lo que se cuantifica es el crecimiento de bifidobacterias; el consumo del carbohidrato y la producción de AGCC, también son herramientas que ayudan a evaluar el potencial prebiótico.^{142, 146, 147} La actividad prebiótica de los AXOS 1 y 2 se determinó en términos de consumos de AXOS, generación de AGCC y lactato, y efecto bifidogénico.

5.2.6.1.1 Consumo de Oligosacáridos. El consumo de AXOS se determinó de las muestras de fermentación, los resultados se muestran en la Figura 5.26 (pp. 137). Se puede apreciar que las bacterias fecales consumen los AXOS y hacen distinción entre los oligosacáridos de mayor y menor peso molecular. Los perfiles de consumo para los dos tipos de AXOS analizados son similares, la caída de concentración se da en las primeras 20 horas de fermentación; sin embargo, los AXOS 2, oligosacáridos de menor GP, son consumidos en mayor proporción por los microorganismos presentes en el inóculo de la microflora fecal en comparación con los AXOS 1 que presentan un GP más alto. Estos resultados indican que el grado de fermentabilidad de los AXOS está directamente relacionado con la complejidad de su estructura. En ninguno de los dos casos los AXOS fueron consumidos en su totalidad, el 20% de AXOS 2 se mantuvo en el medio y solo el 10 % de AXOS 1 permaneció sin consumir.

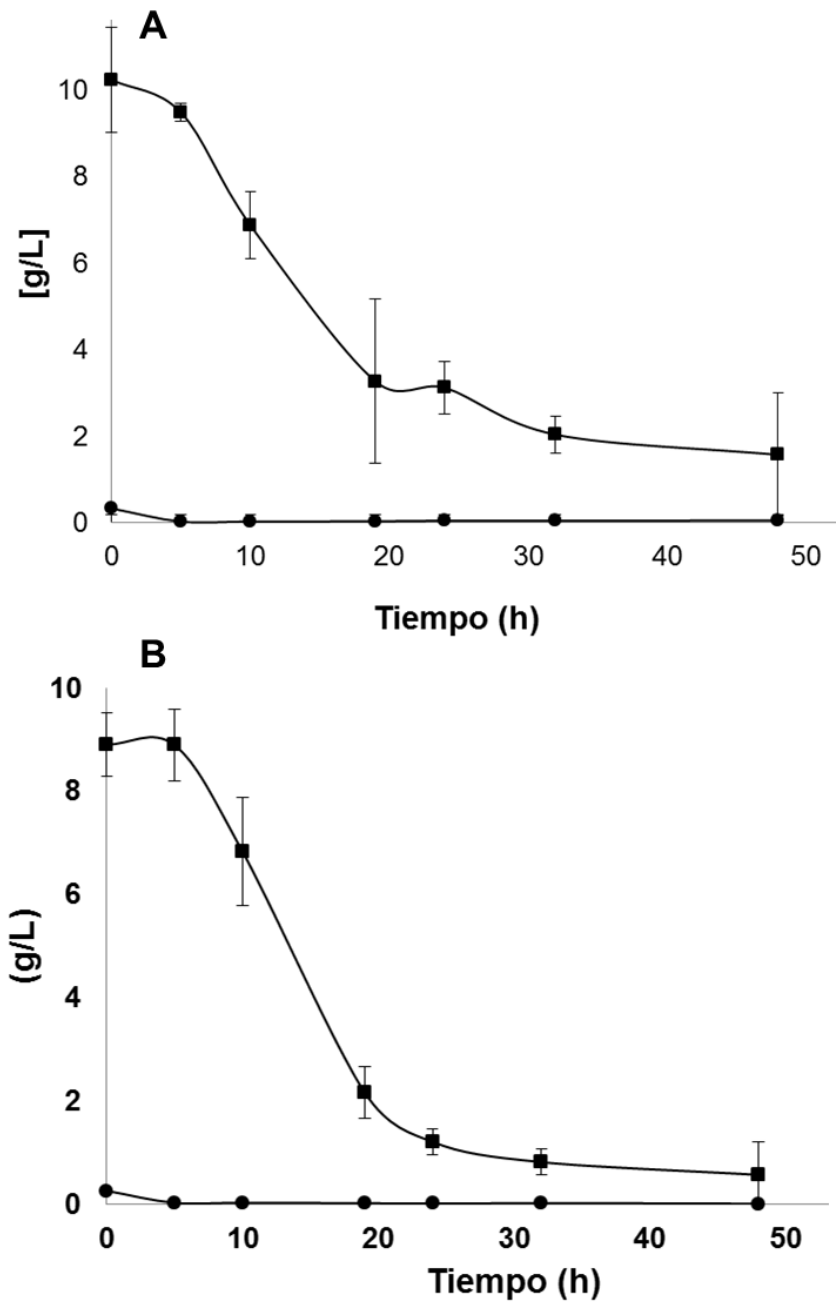


Figura 5.26 Consumo de AXOS por microorganismos del inóculo fecal. A. AXOS 1. B. AXOS 2. ■ AXOS, ● GOS.

5.2.6.1.2 Generación de AGCC y Lactato. El metabolismo de AXOS resultó en la producción de AGCC y lactato. La producción de AGCC es una consecuencia del metabolismo de la microbiota presente en los medios de fermentación. Los productos de fermentación de AXOS y la disminución de pH se midieron en el medio de reacción, los resultados se muestran en la Figura 5.27 (pp. 120). De acuerdo con estudios relacionados, dos periodos se pueden distinguir: en la primera etapa (que dura aproximadamente 19 h), el pH disminuyó significativamente, mientras que el pH se mantuvo bastante constante oscilando alrededor de 5 en los tiempos de fermentación más largos.^{78, 148}

Por otra parte, se puede observar que en ambos casos, los AGCC como formiato, acetato, propionato y butirato, así como succinato y lactato, se generaron en las primeras 5 horas de fermentación. Las proporciones de los metabolitos generados durante la fermentación son similares para los dos tipos de AXOS analizados, pero los AXOS 1 generan menor concentración de metabolitos a lo largo de la fermentación lo que coincide con los resultados del consumo de oligosacáridos donde los AXOS 1 son fermentados en menor medida. Los AXOS 2 presentan mayor generación de metabolitos en todos los tiempos analizados. Las concentraciones más altas de ácidos orgánicos corresponden a acetato, propionato y butirato. Succinato, lactato y formiato aparecieron en concentraciones menores en las primeras etapas de fermentación, para luego disminuir hasta desaparecer en el medio, posiblemente ocasionado porque son el sustrato de otros microorganismos presentes en el inóculo fecal.^{142, 146}

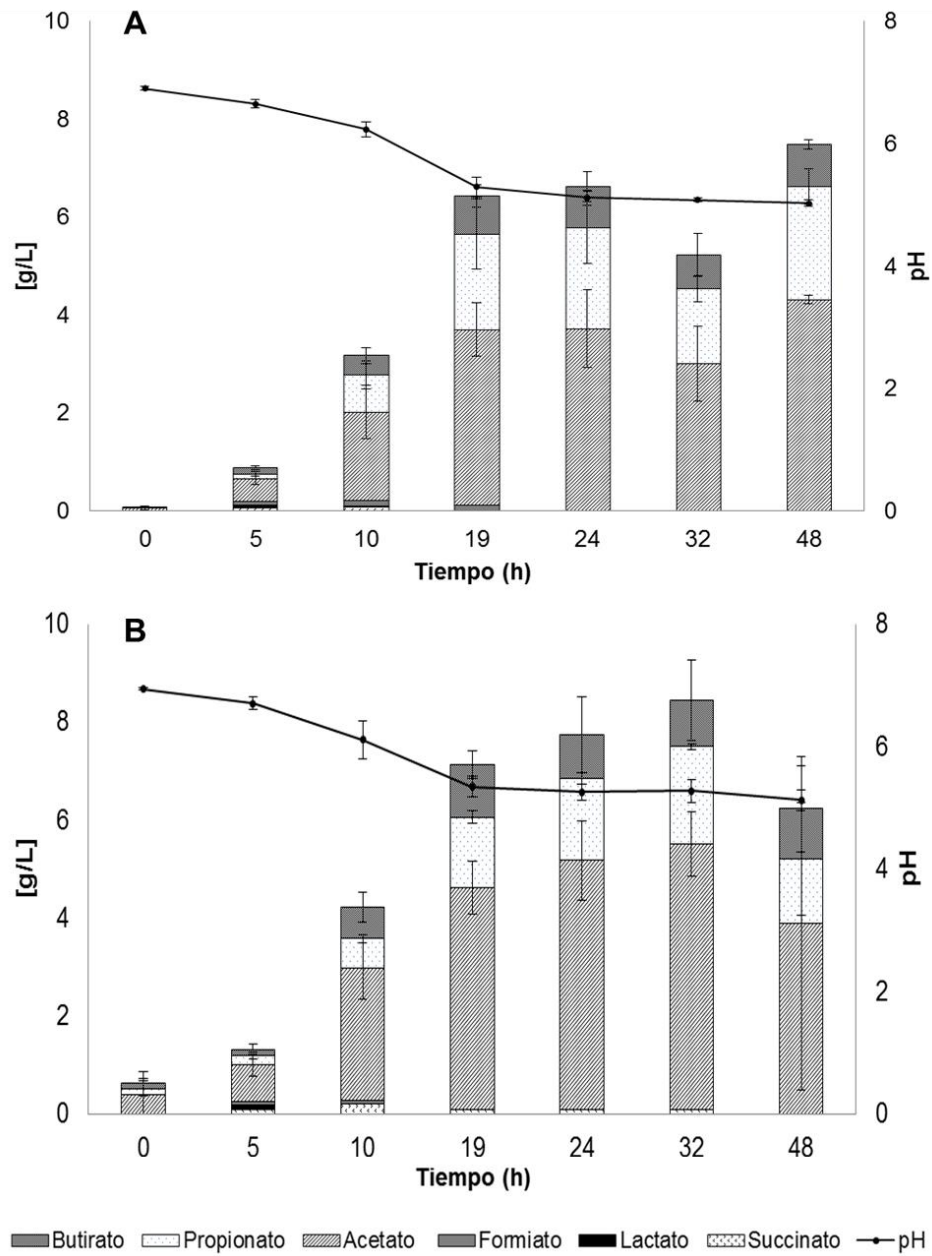


Figura 5.27 Cinética de concentración de AGCC, lactato y valor de pH durante la fermentación de AXOS. A. AXOS 1. B. AXOS 2.

Los FOS fueron usados como un control positivo de la fermentación y agua como control negativo del medio sin carbohidrato añadido. Los resultados de los productos de fermentación para estos controles se muestran en la Figura 5.28 (pp.122) para los AXOS 1 y en la Figura 5.29 (pp. 123 para los AXOS 2. En la fermentación de FOS se puede apreciar que la caída de pH se da en las primeras 10 horas de fermentación, y la generación de los productos de fermentación es más rápida en comparación con los sustratos estudiados.

Los FOS utilizados como control positivo son fermentados más rápidamente; sin embargo, los AXOS generan una concentración mayor de los metabolitos característicos. La lenta fermentabilidad de los AXOS obtenidos a partir del PMN comparada con la fermentabilidad de FOS sugiere que la fermentación parcial de los AXOS puede tener lugar en las partes más distales del colon, donde pueden ayudar a suprimir la fermentación de proteínas minimizando la producción de catabólicos potencialmente tóxicos y aumentar la producción de metabolitos benéficos en esta zona.^{142, 148, 149}

La concentración total de los ácidos producidos en el medio sin fuente de hidratos de carbono (control negativo) era de 3g/L, lo que indica que la mayoría de los ácidos se producen a partir de los AXOS como sustratos. Ésta leve formación de ácidos no provoca una disminución de pH, el cual se mantiene constante con el valor inicial. Una muy baja producción de ácidos en los controles negativos ha sido reportada con anterioridad.^{148, 150}

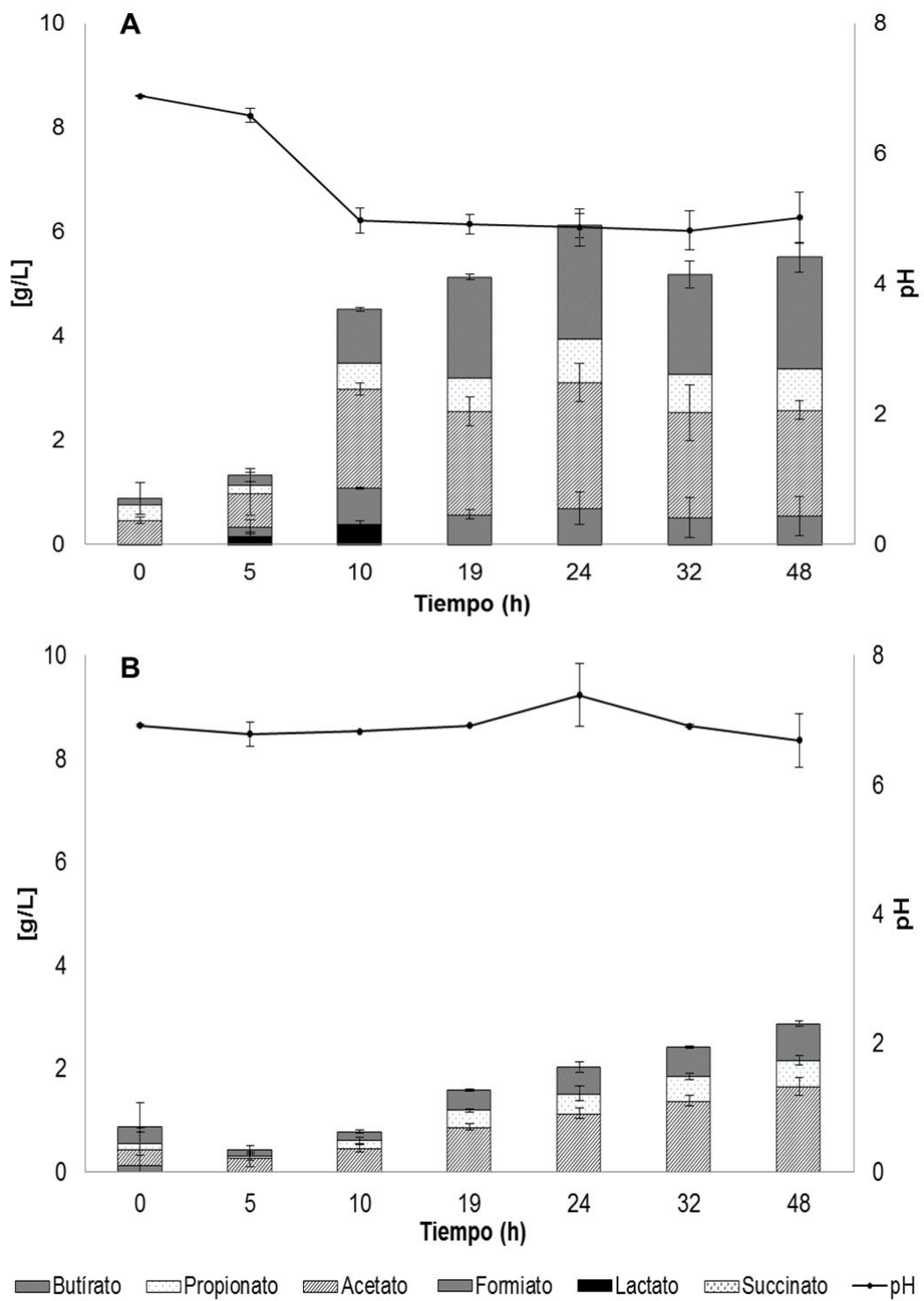


Figura 5.28 Cinética de concentración de AGCC, lactato y valor de pH durante la fermentación de los controles positivo (FOS) y negativo (control de carbohidrato) de AXOS 1. A. FOS 1. B. Control sin carbohidrato.

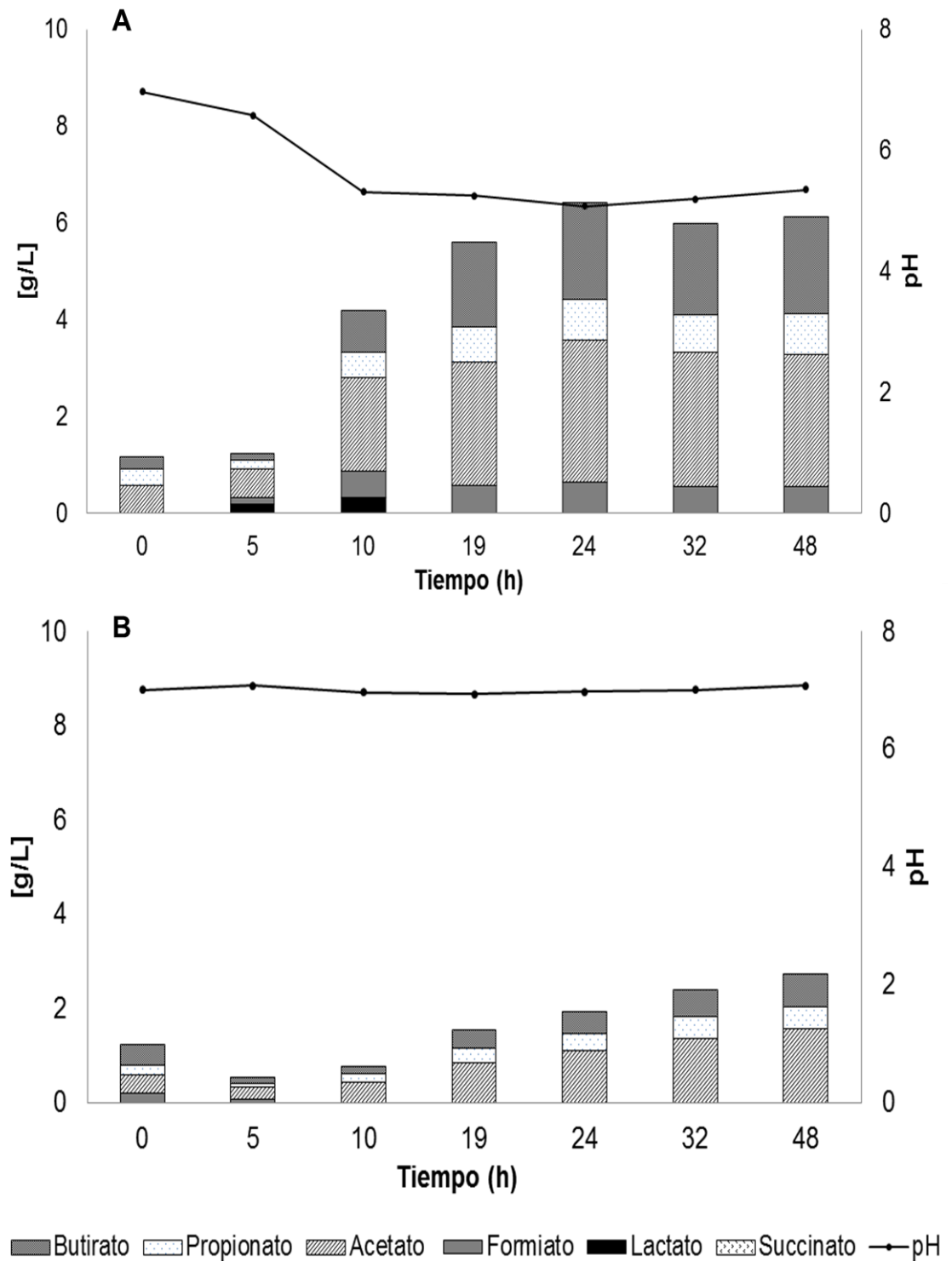


Figura 5.29 Cinética de concentración de AGCC, lactato y valor de pH durante la fermentación de los controles positivo (FOS) y negativo (control de carbohidrato) de AXOS 2. A. FOS 1. B. Control sin carbohidrato.

5.2.6.1.3 Efecto Bifidogénico. Para evaluar el efecto bifidogénico de los AXOS obtenidos se utilizó la técnica de FISH. Como referencia se analizaron cultivos que contienen FOS como fuente de carbono y agua como control negativo en un medio sin carbohidrato añadido. Los resultados se muestran en la Tabla XII.

TABLA XII
CAMBIOS EN LAS POBLACIONES DE BACTERIAS EN CULTIVOS FECALES
EN EL TIEMPO. (Expresado como Log células / mL), media \pm SD; $n=3$

		Tiempo (h)			
		0	5	10	24
AXOS 1	1	8.26 \pm 0.10	8.55 \pm 0.11	8.85 \pm 0.09	9.14 \pm 0.17
	2	7.42 \pm 0.16	7.77 \pm 0.01	7.90 \pm 0.13	8.11 \pm 0.18
AXOS 2	1	8.24 \pm 0.08	8.75 \pm 0.06	9.02 \pm 0.09	9.35 \pm 0.12
	2	7.35 \pm 0.07	7.96 \pm 0.04	8.33 \pm 0.07	8.42 \pm 0.08
FOS	1	8.34 \pm 0.08	8.50 \pm 0.20	8.90 \pm 0.11	9.22 \pm 0.01
	2	7.44 \pm 0.08	7.67 \pm 0.10	8.13 \pm 0.21	8.30 \pm 0.02
Agua (sin carbohidrato añadido)	1	8.29 \pm 0.09	8.08 \pm 0.03	8.22 \pm 0.11	8.24 \pm 0.14
	2	7.08 \pm 0.19	7.14 \pm 0.11	7.18 \pm 0.21	7.22 \pm 0.23

1 Bacterias totales 2 Bifidobacterias

Como se puede observar, los recuentos de Bifidobacterias fueron mayores para los medios que contienen los AXOS y FOS que en los controles negativos, lo que confirma la idoneidad de estos sustratos como fuentes de carbono para el metabolismo de las Bifidobacterias. En términos generales, los resultados indican que los AXOS 1 y AXOS 2 obtenidos causan efectos estimulantes de la población de Bifidobacterias, que fueron similares a los obtenidos con FOS comerciales.

5.2.6.2 Efecto de la Concentración de Oligosacáridos en la Actividad Antioxidante.

La actividad antioxidante se determinó a los AXOS 1 y 2. Los resultados encontrados por el ensayo de poder reductor y FRAP se muestran en la Figura 5.30.

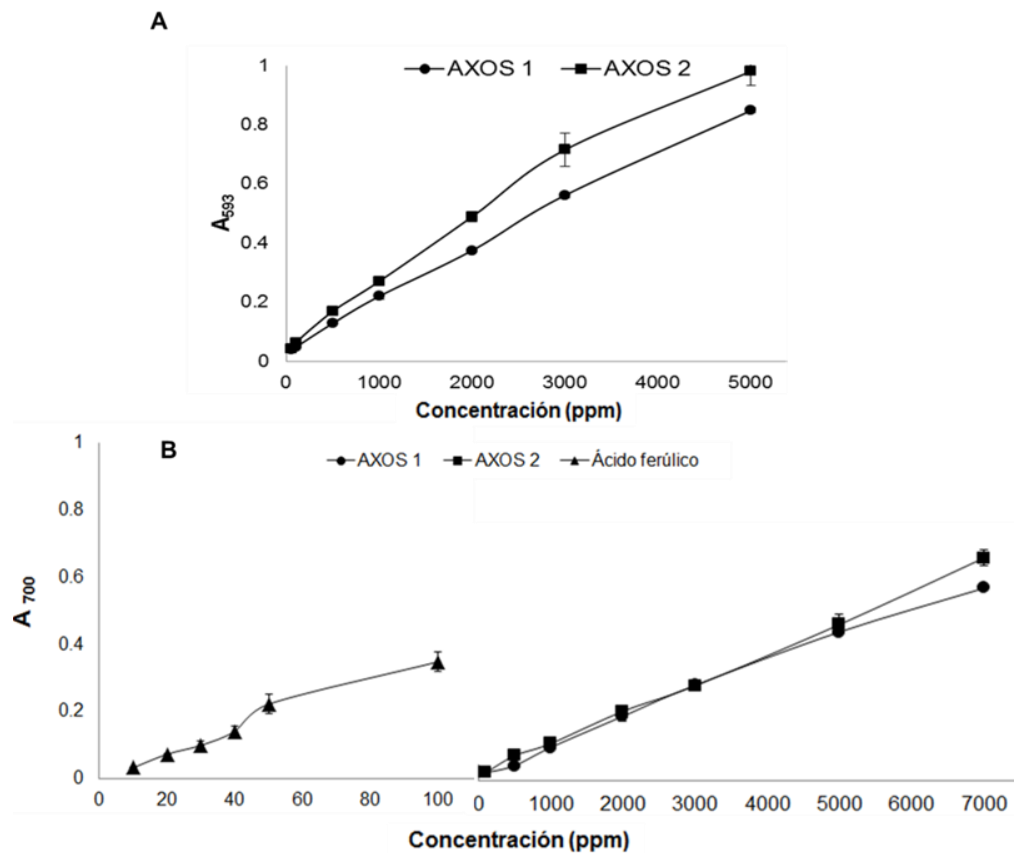


Figura 5.30 Actividad antioxidante de AXOS por el ensayo de FRAP y Poder Reductor. A. Ensayo de FRAP. B. Ensayo de Poder Reductor.

Los resultados indican que los AXOS 2 presentan mayor actividad antioxidante que podemos atribuir a que poseen mayor cantidad de extremos reductores. La actividad antioxidante del ácido ferúlico se determinó de la misma manera que los compuestos estudiados por el ensayo de poder reductor.

El ácido ferúlico presenta una absorbancia de 0.4 con una concentración de 100 ppm, esta capacidad antioxidante se alcanza con aproximadamente 4000 ppm de los AXOS 1 y 2.

Los resultados obtenidos de la actividad antioxidante medida por el ensayo de TEAC se muestran en la Figura 5.31. Se puede observar, contrariamente a lo obtenido por los ensayos de FRAP y poder reductor, que los porcentajes de actividad antioxidante de los AXOS 1 son ligeramente mayores que los obtenidos con los AXOS 2. La actividad antioxidante del ácido ferúlico a 100 ppm es de 60%, este porcentaje se alcanza con aproximadamente 3000 ppm de AXOS 1 o 4000 ppm de AXOS 2.

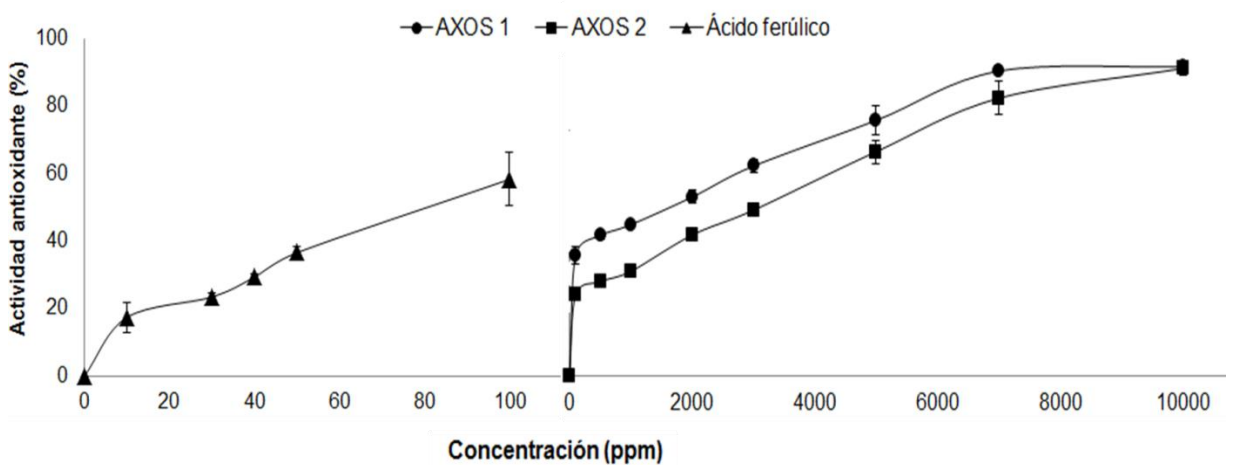


Figura 5.31 Actividad antioxidante de AXOS por el ensayo de TEAC.

La actividad antioxidante evaluada por el ensayo del DFPH se muestra en la Figura 5.32. Se puede apreciar que los AXOS 2 presentan mayores porcentajes de actividad antioxidante que los AXOS 1. Esta actividad, para los AXOS 2 se empieza a notar a 100 ppm mientras que para los AXOS 1 la actividad empieza a presentarse a una concentración 10 veces más alta.

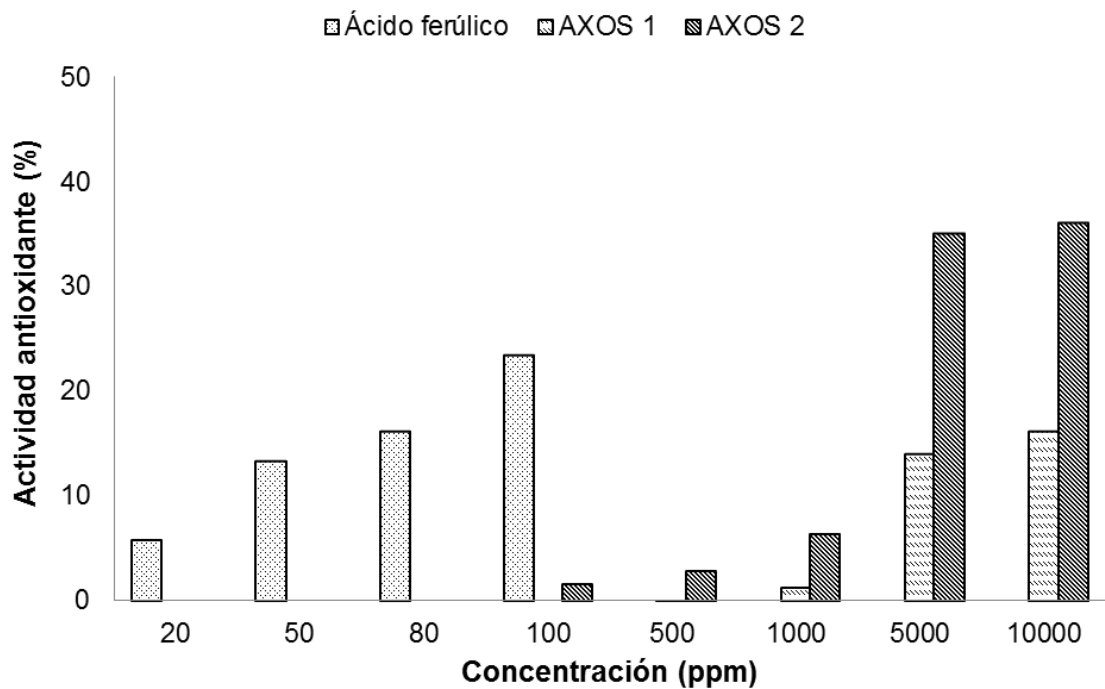


Figura 5.32 Actividad antioxidante de AXOS por el ensayo de DFPH.

Los resultados indicaron que ambos AXOS presentan actividad antioxidante similar para los ensayos de TEAC, FRAP y poder reductor, pero para DFPH, la actividad antioxidante de los AXOS 2 fue el doble que el encontrado para AXOS1.

Veenashri y Muralikrishna (2011) determinaron la actividad antioxidante de XOS obtenidos a través de hidrólisis enzimática de arroz, mijo, trigo y salvado de maíz que conservaban un porcentaje de ácidos fenólicos enlazados. Ellos reportaron que la mezcla de XOS de mijo mostró actividad antioxidante relativamente más alta en comparación con las de arroz, trigo y maíz por ensayos de DFPH y FRAP.⁴²

La concentración a la cual los AXOS liofilizados presentan actividad antioxidante comparable con el estándar de ácido ferúlico es alta, esta concentración es de 4 g/L (4000 ppm) en comparación con la del ácido ferúlico que es de 0.1 g/L (100 ppm), sin embargo, las concentraciones a las cuales se evalúa la actividad prebiótica en estudios *in vitro* e *in vivo* en animales son de 5-10 g/L y la tolerancia de AXOS evaluada en estudios *in vivo* en humanos es de 2-10 g/L. Por lo tanto, a las concentraciones utilizadas para determinar el efecto prebiótico de los AXOS obtenidos a partir del PMN presentan actividad antioxidante.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

En la última década, los prebióticos han surgido como una alternativa profiláctica importante en la prevención de enfermedades debido a su capacidad de modificar la microbiota intestinal. Por lo anterior, son además utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades gastrointestinales.

Los procesos de producción de prebióticos se basan en la generación de oligosacáridos no digeribles a partir de polisacáridos hidrolizables de origen microbiano o vegetal y por síntesis enzimática, química o bioconversión enzimática. Ambos procesos de obtención son importantes debido a que se generan compuestos con deferencias estructurales lo que repercute directamente en el efecto prebiótico que puedan presentar.

Diversos estudios indican que una característica importante en la obtención de prebióticos es la generación de moléculas con capacidad de persistir en el intestino grueso; es decir, que sean fermentados lentamente en el colon. Un grupo potencial son los derivados del arabinoxilano.¹⁴⁹

El arabinoxilano se encuentra presente en la pared celular de las plantas, por lo que se encuentra presente en residuos agroindustriales. Actualmente, existe un gran interés en valorizar los subproductos agrícolas y/o agroindustriales diversificando los métodos y/o condiciones de producción, con vistas a la obtención de nuevas estructuras y compuestos de valor agregado. El pericarpio de maíz nixtamalizado es un residuo que en México se genera en grandes cantidades al ser un subproducto de la industria de la tortilla. Este residuo contiene un alto porcentaje de hemicelulosa por lo que se considera una fuente importante de arabinoxilooligosacáridos.

No existe un método universal para la obtención de oligosacáridos a partir de materiales lignocelulósicos debido a que la composición de la biomasa es diferente. En el presente trabajo se determinó la composición del pericarpio de maíz nixtamalizado. El abundante contenido de arabinosa refleja el alto grado de ramificación del arabinoxilano lo que dificulta la obtención de arabinoxilooligosacáridos por métodos enzimáticos directos. El uso de microorganismos para la producción de un coctel enzimático que contribuyan con la liberación de arabinoxilano y obtención de oligosacáridos se vio mermado por el contenido de almidón en el pericarpio. Además, la nixtamalización ocasiona la pérdida de grupos ácidos que dificulta los métodos de obtención de oligosacáridos por procesos autohidrolíticos en autoclave; sin embargo, también ocasiona la disminución en el contenido en lignina y un aumento en los rendimientos de arabinoxilooligosacáridos en comparación con otros residuos agroindustriales.

A pesar de las dificultades para la obtención de arabinoxilooligosacáridos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado, el doble proceso autohidrolítico en el reactor Parr propuesto en este estudio representa una metodología sustentable que genera una alta conversión de arabinoxilano en los compuestos deseados.

Los fructooligosacáridos, los galactooligosacáridos y la inulina son compuestos con actividad prebiótica probada. Los xilooligosacáridos lineales han demostrado resultados prometedores en estudios *in vitro* y en estudios *in vivo*; sin embargo, los oligosacáridos lineales pueden ser fermentados rápidamente en el colon. Diversos estudios han mostrado que los XOS son preferentemente fermentados por bifidobacterias y de estos los más fermentables son la xilobiosa y xilotriosa.^{77, 149, 151} Gullon y col. (2008) evaluaron la capacidad bifidogénica de XOS obtenidos por tratamiento autohidrolítico a partir de cáscara de arroz, purificados mediante tecnología de membranas y parcialmente hidrolizados con enzimas comerciales para obtener XOS con un GP en el rango 2-6. Los XOS con GP de 2 y 3 favorecieron el crecimiento de *Bifidobacterium* en comparación con los de alto peso molecular donde se presentó menor crecimiento.⁷⁶ Moura (2007) reportó la actividad prebiótica de XOS obtenidos a partir de autohidrólisis de mazorcas de maíz, e indicó que XOS de GP de 3-4 poseen capacidad prebiótica similar a un estándar de xilobiosa y que las bacterias que los consumen en mayor medida son las bifidobacterias.⁷⁷

Los estudios citados previamente se realizaron con cultivos de microorganismos puros o mezclas definidas de grupos microbianos. Resultados recientes con inóculos fecales y técnicas de biología molecular han puesto en evidencia que no solo oligosacáridos con bajo GP presentan actividad prebiótica sino que estructuras de oligosacáridos más complejos también poseen beneficios de potencial prebiótico.

La complejidad de la estructura es una buena opción para el estudio de nuevos prebióticos, donde la fermentación de AXOS de estructuras más complejas puede implicar la persistencia por un periodo más largo durante el paso por el colon.

Hasta hace poco, la información disponible acerca de los AXOS era escasa. Los AXOS difieren en el grado de polimerización y grado de sustitución, la diversidad de estos compuestos es mayor que en otros carbohidratos prebióticos comerciales. Sus efectos prebióticos pueden ser dependientes del tipo de sustitución de arabinosa y la presencia de otros carbohidratos.^{123, 149}

En el 2002, Van Laere y col. estudiaron la fermentación de AXOS de harina de trigo. Ellos encontraron que las estructuras ramificadas presentan mayor utilización por bifidobacterias respecto a las estructuras lineales.¹⁵² Kabel y col. (2002) evaluaron *in vitro* la velocidad de fermentación y la producción de AGCC a partir de XOS con diferentes sustituyentes.¹⁴⁸ En este trabajo, a diferencia del realizado por Van Laere en el 2002, se observó que los XOS no sustituidos y los AXOS fueron más rápidamente fermentados que las estructuras más complejas como los XOS acetilados y los que contienen ácido 4-O-metilglucurónico. Sin embargo, se utilizó un inóculo fecal y sólo se determinó la velocidad de consumo de sustrato, no se identificaron a las bacterias beneficiadas por el mismo.¹⁵²

La degradación de oligosacáridos, la producción de AGCC y lactato dependen de la estructura particular de los oligosacáridos en estudio. Es por lo tanto útil correlacionar las características estructurales de los OND con su capacidad prebiótica para comprender mejor los mecanismos implicados.

En el 2009, Pastell y col. realizaron un estudio de fermentabilidad *in vitro* de D-Xil, L-Ara, XOS y AXOS con diferentes cepas de *Bifidobacterium* (*B. adolescentis*, *B. breve* y *B. longum*) y microbiota fecal humana. Observaron diferencias en la preferencia de sustratos por microorganismos. Por ejemplo, *B. adolescentis* tuvo preferencia para crecer en XOS seguido por D-Xil, pero no L-Ara. Por el contrario, *B. longum* prefirió L-Ara y no creció sobre D-Xil o XOS. A

pesar de que ambos microorganismos fueron capaces de consumir AXOS, los metabolizaron de manera diferente. Después de la liberación de L-Ara, *B. adolescentis* consumió los XOS formados, mientras que *B. longum* fermentó la L-Ara hidrolizada. *B. breve* creció poco en todos los sustratos provistos. Una mezcla de bifidobacterias y la microbiota fecal fueron capaces de utilizar AXOS monosustituídos, pero AXOS con residuos de xilosa disustituídos fueron fermentados solo por la microbiota fecal, lo que sugiere que otros tipos de microorganismos presentes en la microbiota fermentan los AXOS disustituídos.^{148, 149}

Pollet y col. (2011) compararon la fermentabilidad de AXOS de alto y bajo peso molecular obtenidos a partir de AX de salvado de trigo y semillas de *psyllium* por métodos físicos (molienda con bolas de zirconio) y enzimáticos. Los AXOS obtenidos por el método físico presentaron un GP de 42-300 y la relación Ara/Xil fue de 0.14-0.92; mientras que los AXOS producidos enzimáticamente tenían un GP de 4-40 y una relación Ara/Xil de 0.22–0.34. Indicaron que los AXOS producidos enzimáticamente fueron significativamente mejor fermentados (52-53%) que los AXOS producidos a partir del método físico (28-43%).¹²³

En el presente trabajo se evaluó la fermentabilidad de AXOS de alto y bajo peso molecular obtenidos a partir de PMN. El grado de fermentación fue dependiente de la estructura y disminuyó al aumentar la complejidad estructural, es decir, cuando se presenta una mayor relación Ara/Xil y GP. Los AXOS de alto peso molecular y mayor grado de ramificación (GP 19, Ara/Xil 0.42) fueron fermentados en un 80%, mientras que los AXOS de bajo peso molecular (GP 7, Ara/Xil 0.32) fueron fermentados en un 90%. Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los resultados obtenidos por Pollet en el 2011.¹²³

El metabolismo de oligosacáridos a lactato y AGCC era esperado. La concentración de los productos de fermentación de FOS, utilizados como control positivo, fueron menores en comparación con los AXOS estudiados. La generación de ácidos en la fermentación se considera deseable, ya que un aumento de los niveles de AGCC disminuye favorablemente el pH y ayuda a prevenir el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos. Los estudios realizados indicaron que la primera etapa de fermentación, caracterizada por una notable disminución de pH (aproximadamente 19 h), fue más larga que la de otros sustratos analizados donde la primera etapa dura 14 h, lo cual sugiere que los AXOS estudiados en el presente trabajo presentan una fermentación más lenta en comparación con otros estudios debido a su estructura más compleja.

Los AGCC contribuyen a la función normal del intestino grueso y ayudan a prevenir patologías a través de su acción en el lumen y en el epitelio colónico. Los patrones de generación de AGCC dependen de la estructura particular de los oligosacáridos analizados. El acetato fue el metabolito presente en mayor concentración desde el inicio de la fermentación. La producción de acetato se relaciona con el metabolismo de bifidobacterias y bacterias ácido lácticas. Sin embargo, la preferencia de las bifidobacterias por fermentar XOS-sustituidos y que AXOS ramificados obtenidos a partir de trigo fueron hidrolizados (en parte), sólo por especies de *Bifidobacterium spp.* y *Bacteroides spp.*, sugiere que el metabolismo inicial de los AXOS a monómeros fue desencadenado por este tipo de especies presentes en el inóculo fecal.

El lactato y succinato se detectan en bajas concentraciones en las primeras etapas de la fermentación. La producción de lactato puede estar relacionada con el metabolismo de las bacterias de ácido láctico.¹⁵³ Los tiempos más avanzados de la fermentación arrojaron como resultado el agotamiento de lactato y succinato, ambos ácidos son producidos como intermediarios en la

fermentación de hidratos de carbono, y pueden ser convertidos en acetato, propionato y butirato por las bacterias intestinales comunes, lo que confirma que la asimilación de oligosacáridos prebióticos se realiza por una cooperación entre las diferentes especies bacterianas presentes en la microflora, donde los productos generados por microorganismos productores de enzimas extracelulares capaces de romper las moléculas de AXOS e incorporarlos a su metabolismo son consumidos por otras especies bacterianas.

El butirato se encontró en concentraciones menores a las mostradas por los FOS. El butirato es una fuente importante de energía, así como un regulador del crecimiento y de la diferenciación de las células de la mucosa intestinal, promueve la proliferación de células normales y suprime la de las células cancerígenas, incrementando la muerte celular programada en las células transformadas pero no en las células normales. Además se ha relacionado con efectos antitumorales *in vitro* y en estudios en animales con cáncer de colon.¹⁵³

Por otra parte, el acetato y el propionato se encontraron en concentraciones mayores a las registradas por FOS. Estos metabolitos influyen en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, lo que sugiere que los AXOS obtenidos a partir del PMN tendrían mayor influencia en estos beneficios.

Los FOS utilizados como control positivo son fermentados más rápidamente que los AXOS en estudio, la lenta fermentabilidad de estructuras más complejas de AXOS sugiere que éstos pueden llegar a las partes más distales del colon donde ayudan a disminuir la fermentación proteica. La reducción del catabolismo de proteínas en el colon es deseable porque las vías de degradación de aminoácidos en las bacterias resultan en la producción de catabolitos potencialmente tóxicos y posiblemente mutagénicos incluyendo el amoníaco, fenoles y tioles.¹²³



Por otro lado, nuestros estudios indican que una porción de los AXOS obtenidos se encuentran ferulados y presentan actividad antioxidante. Los antioxidantes, al igual que los oligosacáridos prebióticos, son nutraceuticos importantes debido a que protegen al cuerpo de radicales libres, especies reactivas del oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, que se derivan tanto de los procesos metabólicos normales o de fuentes externas.¹²⁴

Los resultados alcanzados sitúan a los AXOS obtenidos a partir del PMN como compuestos prometedores como nutraceuticos multifuncionales al tener aplicaciones potenciales como prebióticos y antioxidantes.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1. Se logró obtener arabinoxilooligosacáridos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado por métodos fisicoquímicos (autohidrólisis).
2. Los métodos biológicos (hidrolisis enzimática) permitieron la disminución del grado de polimerización de los arabinoxilooligosacáridos obtenidos por autohidrólisis.
3. La tecnología de membranas permitió la purificación de los arabinoxilooligosacáridos obtenidos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado.
4. Los oligosacáridos obtenidos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado están compuestos químicamente por moléculas de xilosa y arabinosa. El 77% del ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz nixtamalizado permanece esterificado a moléculas de arabinoxilooligosacáridos después del tratamiento autohidrolítico e hidrólisis enzimática.



5. Los arabinoxilooligosacáridos (AXOS 1 y AXOS 2) obtenidos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado presentan actividad antioxidante en estudios *in vitro*.
6. Los arabinoxilooligosacáridos (AXOS 1 y AXOS 2) obtenidos a partir del pericarpio de maíz nixtamalizado presentan actividad prebiótica en estudios *in vitro*.
7. Los arabinoxilooligosacáridos obtenidos del pericarpio de maíz nixtamalizado se sitúan como compuestos prometedores como nutraceuticos multifuncionales

BIBLIOGRAFÍA

1. Hernández, C., Aguilera, M. G. y Castro, G. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31 (4): 137-151. (2011).
2. Instituto Nacional de Estadística Geográfica, INEGI. (2013). Estadísticas de mortalidad. Recuperado de: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>.
3. Borrueal, N. Probióticos y prebióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Gastroenterología y Hepatología*. 30(7): 419-425, (2007).
4. Remes, J.M. Estreñimiento: evaluación inicial y abordaje diagnóstico. *Revista de Gastroenterología de México*. 70(3): 312-322. (2005).
5. Remes J. Guías de diagnóstico y tratamiento del estreñimiento en México. *Epidemiología (meta-análisis de la prevalencia), fisiopatología y clasificación*. *Revista de Gastroenterología de México*. 2 (76): 126-132. (2011).
6. Grupo de trabajo de la guía de práctica clínica sobre rectorragia. Manejo del paciente con rectorragia. *Guía de Práctica Clínica*. Asociación Española de Gastroenterología, Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria y Centro Cochrane Iberoamericano. Elsevier Doyma, S.L. (2007).
7. Quigley, E. Fried, M. y Gwee, K. A. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología. Síndrome de Intestino Irritable: una perspectiva mundial. *Acta Gastroenterologica Latinoamericana*. 22(2): 106-118. (2011).
8. Organización Mundial de la Salud, OMS. (2013). Cáncer. Fact sheets núm. 297. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>.

9. Secretaria de Salud del Distrito Federal. (2012). Portal Ciudadano del Gobierno del Distrito Federal. Recuperado de: http://www.salud.df.gob.mx/ssdf/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=66&Itemid=307&limit=9&limitstart=81.
10. Nutrisa. (2012). Nutrisa en tu mundo / Mundo Saludable / Mejora tu digestión / Estadísticas. Recuperado de: <http://www.nutrisa.com.mx/entrada-mundo-saludable/estadisticas-digestivos/>.
11. Biruete, A., Juárez, E., Sieiro, E., Romero, R. y Silencio, J. Los nutracéuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría*. 76(3): 136-145. (2009).
12. Domínguez, A., Vázquez, L. y Ramos, G. Revisión del papel de los oligosacáridos prebióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59(4): 358-365. (2009).
13. Gibson, G. y Roberfroid, M. *Handbook of prebiotics*. Editorial CRC Press, New York, E.U. (2008).
14. Madigan, M., Martinko, J. y Parker J. Brock. *Biología de los microorganismos*. Pearson Educación, S.A., Madrid. (2004)
15. Pastell, H., Westermann, P., Meyer, A., Tuomainen, P. y Tenkanen, M. *In vitro* fermentation of arabinoxylan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57: 8598-8606. (2009).
16. Rastall, R.A. y Gibson, G.R. Functional Foods: Developments in colonic functional foods for improved digestive health. *Bioscience-explained Journal*. 2(1): 1-7. (2004)
17. Gibson, G. y Roberfroid, M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*. 125: 1401-1412. (1995).
18. Gibson, G. R. Dietary modulation of human gut microflora using prebiotics. *British Journal of Nutrition*. 80: 209-212. (1998).
19. Cagigas, A. y Blanco, J. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Alimentación y Nutrición*. 16(1): 63-68. (2002).

20. Sastre, A. Fibra y prebióticos: concepto y perspectivas. *Gastroenterología y Hepatología*. 26(1): 6-12. (2003).
21. Bongers, A. y Van Den Heuvel, E. Compuestos prebióticos y biodisponibilidad de minerales y oligoelementos. *Gastroenterología y Hepatología*. 26(1): 50-63. (2003).
22. Marti, A., Moreno, M. y Martínez, A. Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico. *Nutrición Hospitalaria*. XVIII (4): 181-188. (2003).
23. Ros, E. Prebióticos y probióticos en la regulación del metabolismo de los lípidos. *Gastroenterología y hepatología*. 26(1): 31-36. (2003).
24. Burns, A. y Rowland, I. Prebióticos y probióticos en la prevención del cáncer de colon. *Gastroenterología y hepatología*. 26(1): 73-84. (2003).
25. Crittenden, R. G. Prebiotics. In: *Probiotics: A Critical Review*. Horizon Scientific Press. Wymondham, UK. (1999).
26. Damen, B., Pollet, A. Dornez, E., Broekaert, W., Van Haesendonck, I., Trogh, I., Arnaut, F., Delcour, J. y Courtin, C. Xylanase-mediated *in situ* production of arabinoxylan oligosaccharides with prebiotic in whole meal breads and breads enriched with arabinoxylan rich materials. *Food Chemistry*. 131: 111-118. (2012).
27. Macfarlane, G. T. y Gibson, G. R. Carbohydrate fermentation, energy transduction and gas metabolism in the human large intestine. In *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman and Hall, London. (1997).
28. Parés, R. y Juárez A. *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté S.A. España. (2002).
29. Blaut, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal Nutrition*. 41(1): 11-16. (2002).
30. Mussatto, S.I. y Mancilha, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers*. 68: 587-597. (2007).
31. Delzenne, N. M. y Roberfroid, M. R. Physiological effects of non-digestible oligosaccharides. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*. 27: 1-6. (1994)

32. Crittenden, R. G. y Playne, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends in Food Science and Technology*. 7: 353-361. (1996).
33. Xandri, J.M. II Aula Nestlé de Actualidad en Nutrición: Hidratos de carbono y fibra. Nestlé Nutrition. Informe Técnico. (2004).
34. McCartney, A.L. y Gibson, G.R. The application of prebiotics in human health and nutrition. In: *Proceedings of Lactic 97. Which Strains? For which Products?*. Adria Normandie Press, Paris. (1998).
35. Gibson, G. y Wang, X. Enrichment of bifidobacteria from human gut contents by oligofructose using continuous culture. *FEMS Microbiology Letters*. 118(1-2): 121-128. (1994).
36. Wang, X. y Gibson, G.R. Effects of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 373–380. (1993).
37. Molly, K., Woestyne, M. y Verstraete, W. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 39: 254–258. (1993).
38. Van Loo, J. Roberfroid, M. y Gibson, G. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *Journal of Nutrition* 128(1): 9–11. (1998).
39. De Palma, G., Nadal, I., Collado, M. y Sanz, Y. Effects of a gluten-free diet on gut microbiota and immune function in healthy adult human subjects. *British Journal of Nutrition*. 102: 1154–1160. (2009).
40. Hughes, S., Shewry, P., Gibson, G., McCleary, B. y Rastall, R. *In vitro* fermentation of oat and barley derived b-glucans by human faecal microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*. 64: 482-493. (2008).
41. Antolovich, M., Prenzler, P., Patsalides, E., McDonald, S. y Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127: 183-198. (2002).
42. Veenashri, B. y Muralikrishna, G. *In vitro* anti-oxidant activity of xylo-oligosaccharides derived from cereal and millet brans - A comparative study. *Food Chemistry*. 126: 1475-2481. (2011).

43. Vitaglione, P., Napolitano, A. y Fogliano, V. Cereal dietary fibre: A natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science and Technology*. 19(9): 451–463. (2008).
44. Mathew, S. y Abraham, E. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 380 (4): 587-605. (2004).
45. Adom, K. y Liu, R. Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6182-6187. (2002).
46. Trombino, S. Serini, F. Di Nicuolo, L. Celleno, S. Ando, N. Picci, G. Calviello, y P. Palozza. Antioxidant effect of ferulic acid in isolated membranes and intact cells: synergistic interactions with α -tocopherol, β -carotene, and ascorbic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 52: 2411-2420. (2004).
47. Juranic, Z. y Zizak, Z. Biological activities of berries: From antioxidant capacity to anti-cancer effects. *BioFactors*. 23: 207–21. (2005).
48. Rycroft, C., Jones, M., Gibson, G. y Rastall, R. A comparative *in vitro* evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal Applied Microbiology*. 91:878-887. (2001).
49. Cheng, S. y Zhu, S. Lignocellulosic feedstock biorefinery-the future of the chemical and energy industry. *BioResources*. 4(2): 456-457. (2009).
50. Hafizoglu, H. y Usta, M. Chemical composition of coniferous wood species occurring in Turkey. *Holz als Roh- und Werkstoff*. 63: 83–85. (2005).
51. Hall, M., Hansen, N. y Rudra, A. Effect of species, age and wood characteristics on eucalypt kraft pulp quality. *Appita* 26: 348–354. (1973).
52. Wodzicki, T. J. Natural factors affecting wood structure. *Wood Science and Technology*. 35 (1-2): 5–26. (2001).
53. Fengel, D. y Wegener, G. *Wood: chemistry, ultrastructure and reactions*. Walter de Gruyter, New York, E. U. 2-220 (1984).
54. Shlesser, R. Ethanol production in Hawaii. Report State of Hawaii, Energy Division, Department of Business, Economic Development and Tourism, Honolulu HI USA. (1994).

55. Jeffries, T. W., *Biochemistry of Microbial Degradation*, cap. Biodegradation of lignin and hemicelluloses. Kluwer Academic Amsterdam, Netherlands. 233-277. (1994).
56. Coppen, J., Gay, C., James, D., Robinson J., y Mullin L. Xylem resin composition and chemotaxonomy of three varieties of *Pinus caribaea*. *Phytochemistry*. 33: 1103-1111. (1993).
57. Sjöström, E. y Alen, R. *Analytical methods in wood chemistry, pulping and papermaking*. Springer, Berlin. 316. (1999).
58. Holtzapple, M. *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*. Academic Press, London. 2324-2334 (1993).
59. Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia T. y J. Martínez. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology: Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*. 5 (2): 53-63. (2002).
60. Ebringerová, A. y Heinze, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*. 21: 542–556. (2000).
61. Wilkie, K. Hemicellulose. *Chemtechnology*. 13: 306–319. (1983).
62. Christiernin, M., Ohlsson, A., Berglund, T. y Henriksson, G. Lignin isolated from primary walls of hybrid aspen cell cultures indicates significant differences in lignin structure between primary and secondary cell wall. *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 777–785. (2005).
63. Izydorczyk, M. y Biliaderis, C. Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*. 28(1): 33-48. (1995).
64. Aspinall, G.O. Arabinans and Xylans. In: *Polysaccharides*. Pergamon Elmsford, New York, E. U. 103-115. (1970).
65. Andreasen, M., Kroon, P., Williamson, G. y García-Conesa, M. Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(11): 5679-5684. (2001).

66. Baublis, A., Clydesdale, F. y Decker, E. Antioxidants in wheat-based breakfast cereals. *Cereal Foods World*. 45: 71-74. (2000).
67. Ebringerová, A., Hromádková, Z., Petráková, E. y Hricovíni, M. Structural features of a water-soluble L-arabino-D-xylan from rye bran. *Carbohydrate Research*. 198, 57-66. (1990).
68. Yang, C., Yang, S. y Liu, W. Production of xilooligosaccharides from xylans by extracellular xylanases from *Thermobifida fusca*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 3955-3959. (2007).
69. Aspinall, G. Chemistry of cell wall polysaccharides. *Plant Biochemistry*. 3: 473-500. (1980).
70. Hartley, R.D. Lignin-carbohydrate linkages in plant cell walls. I. Carbohydrate esters of ferulic acid as components of cell walls of *Lolium multiflorum*. *Phytochemistry*. 12(3): 661-665. (1973).
71. Barl, B., Biliaderis, C., Murray, E. y MacGregor, A. Combined chemical and enzymic treatments of corn husk lignocellulosics. *Science of Food and Agriculture*. 56(2): 195-214. (1991).
72. Zhu, Y., Kim, T., Lee, Y., Chen, R. y Elander, R. Enzymatic production of xilooligosaccharides from corn stover and corn cobs treated with aqueous ammonia. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129-132: 586-598. (2006).
73. Vegas, R., Alonso, J., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Processing of Rice Husk Autohydrolysis Liquors for Obtaining Food Ingredients. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 44(24): 1608-1614. (2004).
74. Akpınar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U. y Yilmaz, L. Enzymatic production of xilooligosaccharides from cotton stalks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 5544-5551. (2007).
75. Zhu, H., Wang, F., Huang, W., Zheng, J. y Rayas, P. Rheofermentometer fermentation and breadmaking characteristics of dough containing xylo-oligosaccharide hydrolyzate from wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 1878-1883. (2010).

76. Gullon, P., Moura, P., Esteves, M., Girio, F., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husk by probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 7482-7487. (2008).
77. Gullon, P., González, M., Van Gool, M., Arie, H., Hirsch, J., Ebringerová, A. y Parajó, J. C. Production, refining, structural characterization and fermentability of rice husk xylooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 3632-3641. (2010).
78. Moura, P., Barata, R., Carneiro, F., Gírio, F., Loureiro, M. y Esteves, P. *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Food Science Technology*. 40(6): 963-972. (2007).
79. Rose, D. y Inglett, G. Production of feruloylated arabinoxylo-oligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. *Food Chemistry*. 119: 1613-1618. (2010).
80. Carneiro, M., Esteves, J., Parajó, J. C., Pereirac, H. y Gírio, F. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technology*. 91(1): 93-100. (2004).
81. Alonso, J., Domínguez, H., Garrote, G., Parajó, J. C. y Vázquez, M. Xylooligosaccharides: properties and production technologies. *Electronic Journal of Environmental and Food Chemistry*. 2(1): 230-233. (2003).
82. Sivers, M. y Zacchi, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*. 51(1): 43-52. (1995).
83. Montané, D., Farriol, X. y Salvadó, J. Fractionation of wheat straw by steam-explosion pretreatment and alkali delignification. Cellulose pulp and byproducts from hemicellulose and lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 18(2): 171-191. (1998).
84. Cruz, J., Domínguez, J., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. *Food Biotechnology*. 14(1-2): 79-97. (2000).

85. Mussatto, S.I. y Roberto, I.C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 85(14): 2453-2460. (2005).
86. Garrote, G., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Mild autohydrolysis: An environmentally friendly technology for xylooligosaccharide production from wood. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 74(11): 1101-1109. (1999).
87. Bouchard, J., Abatzoglou, N., Chornet, E. y Overend, R. Characterization of depolymerized cellulosic residues. Part 1: Residues obtained by acid hydrolysis processes. *Wood Science and Technology*. 23(4): 343-355. (1989).
88. Bozell, J., Black, S. y Myers, M. Clean. Fractionation of Lignocellulosics. A new process for preparation of alternative feedstocks for the chemical industry. *Proceedings of the eighth International Symposium of Wood and Pulping Chemistry*. 697-704 (Helsinki, Finland). (1995).
89. Taherzadeh, M.J., Niklasson, C. y Lidén, G. Acetic acid—friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Science*. 52(15): 2653-2659. (1997).
90. Sasaki, M., Adschiri, T. y Arai, K. Fractionation of sugarcane bagasse by hydrothermal treatment. *Bioresource Technology*. 86(1): 301-304. (2003).
91. Vegas, R., Alonso, J., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Manufacture and refining of oligosaccharides from industrial solid wastes. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 44(3): 614-620. (2005).
92. Carvalheiro, F., Garrote, G., Parajó, J. C., Pereira, H. y Gírio, F. Kinetic modeling of brewery's spent grain autohydrolysis. *Biotechnology Progress*. 21(1): 233-243. (2005).
93. Clark, T. y Mackie, K. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 34B(2):101-110. (1984).
94. Bonn, G., Pecina, R., Burtscher, E. y Bobleter, O. Separation of wood degradation products by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. 287(1): 215-221. (1984).

95. Melamed, T. y Levitin, B. Production and use of 5-hydroxymethylfurfural. *Gidroliz Lesokhim Prom-st* 7: 28-30. (1983).
96. Sjöström, E. *Wood chemistry: fundamentals and applications*. Academic Press, San Diego. 293. (1993).
97. Garrote, G., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Manufacture of xylose-based fermentation media from corncobs by posthydrolysis of autohydrolysis liquors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 95(3): 195-207. (2001).
98. De Vries, R. P. y Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65: 497-522. (2001).
99. Christakopoulos, P., Nerinckx, W., Kekos, D., Macris, B. y Claeysens, M. The alkaline xylanase III from *Fusarium oxysporum* F3 belongs to family F10. *Carbohydrate Research*. 302(3-4): 191-195. (1997).
100. Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M. y Kluepfel D. Endo-1,4-xylanase families: differences in catalytic properties. *Journal Biotechnological*. 57: 151-166. (1997).
101. Kulkarni, N., Shendye, A. y Rao, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 23: 411-455. (1999).
102. Van Laere, K.M.J., Beldman, G. y Voragen, A.G.J. A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47:231-235. (1997).
103. Tenkanen, M. Enzymatic tailoring of hemicelluloses. *ACS symposium series*. 864: 292- 311. (2004).
104. Davis G. y Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3(9): 853-859. (1995).
105. Vegas, R., Alonso, J.L., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Enzymatic processing of rice husk autohydrolysis products for obtaining low molecular weight oligosaccharides. *Food Biotechnology*. 22: 31-46. (2008).

106. Gupta, U. y Kar, R. Optimization and scale up cellulose free endo xylanase production by solid state fermentation on corn cob and by immobilized cells of a thermotolerant bacterial isolate. *Jordan Journal Sciences*. 1(3): 129-134, (2008).
107. Ragagnin, C., Serrano, I., Pavarina, E., Fonseca, A., Franciscan, E. y Durrant, L. Production of xylooligosaccharides from enzymatic hydrolysis of xylan by whit-rot fungi *Pleurotus*. *Acta Scientiarum Technology*. 32(1): 37-42. (2010).
108. Katapodis, P. y Christakopoulos, Paul. Enzymatic production of feruloyl xylo-oligosaccharides from corn cobs by a family 10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus*. *Food Science and Technology*. 41(7):1239-1243. (2008).
109. Defloor, I., Vandereycken, V., Grobet, P. y Delcour, J. Fractional precipitation of maltodextrines by ethanol. *Journal of Chromatography* 803: 103-109. (1998).
110. Ishihara, M., Nojiri, M., Hayashi, N. y Shimizu, K. Isolation of xylan from hardwood by alkali extraction and steam treatment. *Mokuzai Gakkaishi*. 42(12): 1211-122. (1996).
111. Grandison, A., Goulas, A. y Rastall, R. The use of dead-end and cross-flow nanofiltration to purify prebiotic oligosaccharides from reaction mixtures. *Journal of Science and Technology*. 24: 915-928. (2002).
112. Jorda, J., Marechal, P., Rigal, L. y Pontalier, P-Y. Biopolymer purification by ultrafiltration. *Desalination*. 148: 187-191. (2002).
113. Robyt, J.F. y Mukerjea, R. Separation and quantitative determination of nanogram quantities of maltodextrins and isomaltodextrins by thin-layer chromatography. *Carbohydrate Research*. 251: 187-202. (1994).
114. Scherz H. y Bonn G. *Analytical Chemistry of Carbohydrates*. Thieme Medical Publishers, Stuttgart. (1998).
115. Bock, K., Pedersen, C. y Pedersen, H. Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 42: 193-225. (1984).

116. Rutherford, T. y Homans, S. Proton resonance assignments in oligosaccharides containing multiple monosaccharide residues of the same type. *Journal of Magnetic Resonance*. 106(1): 10-13. (1995).
117. Kabel, M., Schols, H. y Voragen, A. Mass determination of oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry following HPLC, assisted by on-line desalting and automated sample handling. *Carbohydrate Polymers*. 44(2): 161-165. (2001).
118. Eggleston, G. y Coté G. Oligosaccharides in food and agriculture. *ACS Symposium Series*. 849: 1-14. (2003).
119. Rodríguez P. Caracterización de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes del quitosano y extracto de pericarpio de maíz para la elaboración de un polímero modificado. Tesis MC. UANL. (2009).
120. Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. Production of antioxidants by non-isothermal autohydrolysis of lignocellulosic wastes. *Food Science and Technology*. 44: 436-442. (2011).
121. Veenashri, B. y Muralikrishna, G. *In vitro* anti-oxidant activity of xylo-oligosaccharides derived from cereal and millet brans - A comparative study. *Food Chemistry*. 126: 1475-2481. (2011).
122. Vila, C. Métodos analíticos. Impression FC, España. (2004).
123. Pollet, A., Van Craeyveld, V., Van de Wiele, T., Verstraete, W., Delcour, J. y Courtin C. *In vitro* fermentation of arabinoxylan oligosaccharides and low from wheat (*Triticum aestivum* L.) bran and psyllium (*Plantago ovate* Forsk) seed husk. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 60: 946-954. (2011).
124. Conde, E., Gullón, P., Moure, A., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Fractionation of industrial solids containing barley husks in aqueous media. *Food and Bioproducts Processing*. 87: 208-214. (2009).
125. Folin, O. y Ciocalteu, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The Journal of biological chemistry*. 73(2): 627-650 (1927).
126. Singleton, V. y Rossi, J. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic -phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158. (1965).

127. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26: 1231-1237. (1999).
128. Oyaizu, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315. (1986).
129. Benzie, I. y Strain, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239: 70-76. (1996).
130. Conde, E., Moure, A., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Fractionation of antioxidants from autohydrolysis of barley husks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 10651-10659. (2008).
131. von Gadow, A., Joubert, E. y Hansmann, C.F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 632-637. (1997).
132. Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Kolida, S., Collins, M., Rastall, R. y Gibson, G. Exopolysaccharides produced by *Bifidobacterium longum* IPLA E44 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* IPLA R1 modify the composition and metabolic activity of human microbiota in pH-controlled batch cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 135: 260-267. (2009).
133. Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical chemistry*. 31: 426-428. (1959).
134. Somogyi, M. Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195(1): 19-23. (1952).
135. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry*. 153: 375-380. (1944).
136. Dubois, M., K.A. Guilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers y F. Smith. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*. 28: 350-356. (1956).

137. Martínez, F., Martínez, H.E., Sanmartín, E., Sánchez, F., Chang, Y.K., Barrera, D. y Rios, E. Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 81: 1455-1462. (2001).
138. Parajó, J. C., Garrote, G., Cruz, J.M. y Domínguez, H. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science and Technology*. 15: 115-120. (2004).
139. Moure, A. Domínguez, H. y Parajó J. C. Antioxidant activity of liquors from aqueous treatments of *Pinus radiata* wood. *Wood Science and Technology*. 39: 129-139. (2005).
140. Ghosh, V. K. y Deb, J. K. Production and characterization of xylanase from *Thielaviopsis basicola*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29: 1469-1476. (1988).
141. Garrote, G., Yáñez, R., Alonso, J.L. y Parajó, J. C. Coproduction of oligosaccharides and glucose from corncobs by hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 47: 1336-1345. (2008).
142. Gullón, P., González, M. y Parajó, J. C. Manufacture and prebiotic of oligosaccharides derived from industrial solid wastes. *Bioresource Technology*. 102: 6112-6119. (2011).
143. Terpinč, P.; Ceh, B.; Poklar, N.; Abramovic, H. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Industrial Crops and Products*. 39: 210-217. (2012).
144. Garrote, G., Cruz, J.M., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Non-isothermal autohydrolysis of barley husks: Product distribution and antioxidant activity of ethyl acetate soluble fractions. *Journal of Food Engineering*. 84: 544-552. (2008).
145. Velazco-Martínez, M., Angulo, O., Vázquez-Courtier, D. L., Arroyo-Lara, A. y Monroy-Rivera, J. A. Effect of dried solid of nejayote on broiler growth. *Metabol. Nutr.* 76: 1531-1534. (1997).
146. Gullón, B., Gullón, P., Sanz, Y., Alonso, J.L. y Parajó, J. C. Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *Food Science and Technology*. 44: 1687-1696. (2011)

147. Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H. y Parajó, J. C. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*. 41(9): 1913–1923. (2006).
148. Kabel, M., Kortenoeven, L., Schols, H. y Voragen, A. *In vitro* fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50: 6205-6210. (2002).
149. Pastell, H., Westermann, P., Meyer, A, Tuomainen, P. y Tenkanen, M. *In vitro* fermentation of arabinoxilan-derived carbohydrates by bifidobacteria and mixed fecal microbiota. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57: 8598-8606. (2009).
150. Hartemink, R., Schoustra, S. E. y Rombouts, F. M. Degradation of guar gum by intestinal bacteria. *Bioscience Microflora*. 18: 17-25. (1999).
151. Depeint, F., Tzortzis, G., Vulevic, J., l'Anson, K. y Gibson, G. Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharides mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium* mixture NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*. 87: 785-79. (2008).
152. Van Laere, K., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. y Voragen, A. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48: 1644-1652. (2000).
153. Topping, D. L., y Clifton, P. M. Short chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and non starch polysaccharides. *Physiological Reviews*. 81: 1031-1064. (2001).



APENDICE 1

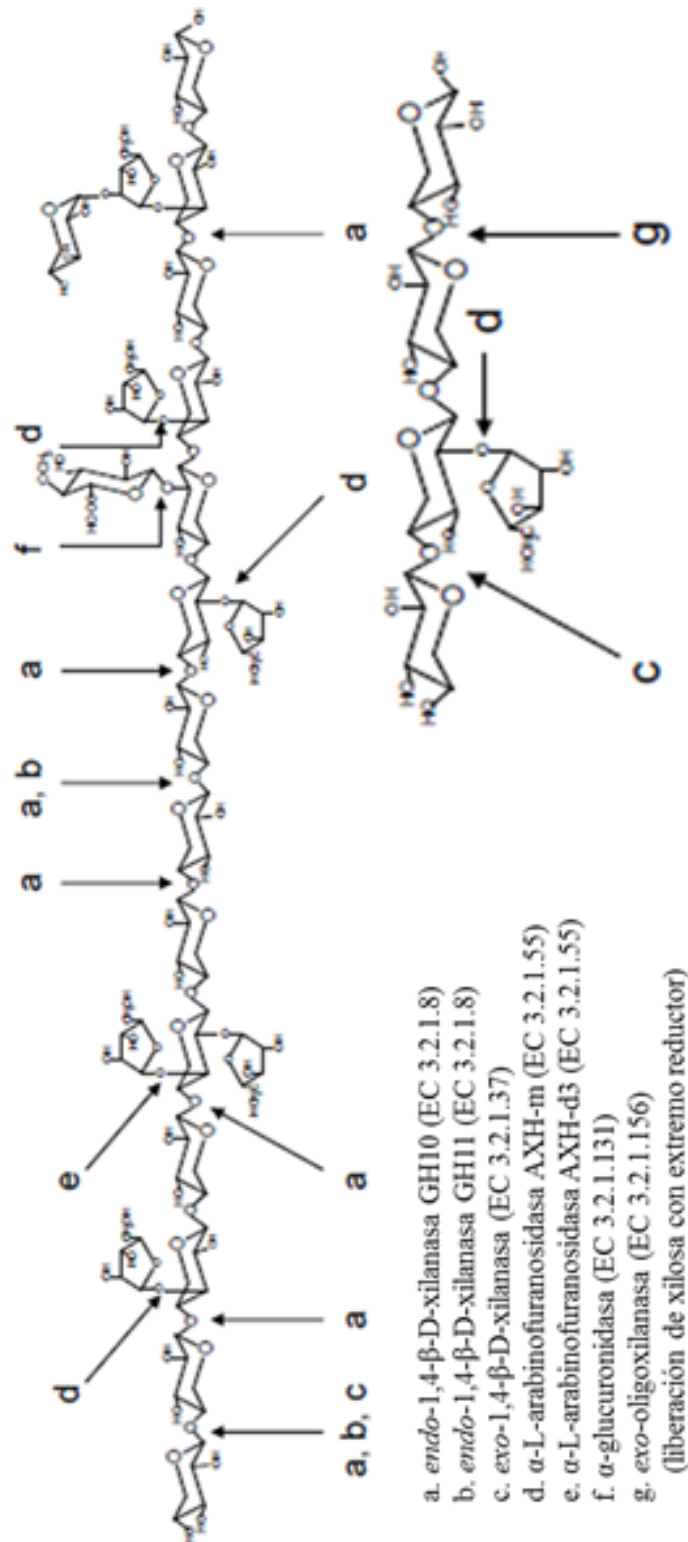


Figura 1.10. Estructura del arabinoxilano de cereales y las enzimas para su hidrólisis. Sitios de hidrólisis de la cadena principal del xilano (a-c), sitios de hidrólisis de los sustituyentes (d-f). Hidrólisis de xilosa con extremo reductor (g).