



UNIVERSIDAD DE BURGOS

FACULTAD DE CIENCIAS

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y CIENCIA DE
LOS ALIMENTOS**

ÁREA DE INGENIERÍA QUÍMICA

MÁSTER EN SEGURIDAD Y BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

TUTORES ACADÉMICOS: María Olga Ruíz Pérez y María Teresa Sanz Diez

***RECUPERACIÓN DE COMPUESTOS
FENÓLICOS DE SALVADOS DE TRIGO
MEDIANTE UN PROCESO DE EXTRACCIÓN
ENZIMÁTICA Y ULTRASONICACIÓN***

AUTORA: Melanie Ortiz Santiso

JULIO 2019



AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO: 2018/2019

D/Dña. María Teresa Sanz Diez y María Olga Ruiz Pérez Directoras del Trabajo fin de Máster de D/Dña. Melanie Ortiz Santiso, que lleva por título "Recuperación de compuestos fenólicos de salvados de trigo mediante un proceso de extracción enzimática y ultrasonificación"

Autorizan No autorizan

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, a 10 de julio de 2019

Fdo.: María Teresa Sanz Diez

Fdo.: María Olga Ruiz Pérez

AUTORIZACIÓN DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER AL REPOSITORIO (RIUBU)

D/Dña. Melanie Ortiz Santiso y D/Dña. María Olga Ruiz Pérez Autora y Directora del Trabajo fin de Máster autorizan que esta memoria sea transferida al Repositorio Institucional de la Universidad de Burgos (RIUBU) en la siguiente modalidad:

Acceso restringido Acceso abierto Acceso abierto con periodo de embargo

Burgos, a 10 de julio de 2019

Fdo. Melanie Ortiz Santiso

Fdo.: María Olga Ruiz Pérez

Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de Investigación VALORIZACIÓN INTEGRAL DE SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA AGROALIMENTARIA MEDIANTE TECNOLOGÍAS EMERGENTES (ALVALOR) financiado por la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BU301P18) y desarrollado en el Grupo de investigación Biotecnología Industrial y Medioambiental, reconocido por la UBU (GIR-UBU BIOIND) y por la Junta de Castilla y León como Unidad de Investigación Consolidada UIC-128.



ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. PARTE EXPERIMENTAL	3
3.1 MATERIALES	3
3.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS ANALÍTICOS.....	4
3.2.1 MÉTODOS ANALÍTICOS	5
3.3 SELECCIÓN DE LA FRACCIÓN DE CELULASA, PROTEASA Y XILANASA EN LA MEZCLA.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4.1 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN CON AGUA Y DE EXTRACCIÓN ÁCIDA A pH 5	7
4.1.1 ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES CINÉTICOS DE EXTRACCIÓN. COMPARACIÓN DE RESULTADOS	8
4.2 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN UTILIZANDO CELULASA.....	9
4.3 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN UTILIZANDO PROTEASA Y XILANASA.....	11
4.4 COMPARACIÓN DE LOS COEFICIENTES CINÉTICOS PARA LA EXTRACCIÓN CON CELULASA, PROTEASA O XILANASA.	12
4.5 SELECCIÓN DE LA FRACCIÓN ÓPTIMA DE CELULASA, PROTEASA Y XILANASA..	12
4.6 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN CON DISTINTOS TIPOS DE SALVADO DE TRIGO	16
5. CONCLUSIONES	19
6. BIBLIOGRAFÍA	19



RESUMEN

En esta memoria se recogen los resultados experimentales del estudio de extracción de compuestos fenólicos de distintos tipos de salvado de trigo (ST) empleando un proceso combinado de extracción enzimática y ultrasonificación, así como la caracterización de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de operación. Los salvados empleados en el estudio fueron los catalogados industrialmente como salvado de hoja, de cuarta y de tercerilla. En la primera etapa del trabajo, se ha examinado el proceso de extracción enzimática en baños agitados y asistida por ultrasonificación para la recuperación de compuestos fenólicos de un ST de cuarta utilizando distintas cantidades de celulasa, xilanas, proteasa y su combinación. Los resultados de las cinéticas de extracción han mostrado que la velocidad de extracción de compuestos fenólicos del ST de cuarta es más rápida bajo el efecto del fenómeno de cavitación y utilizando proteasa como biocatalizador. Un diseño de experimentos basado en la superficie de respuesta fue utilizado para determinar la fracción óptima de celulasa, xilanas y proteasa por gramo de ST. Como etapa final del trabajo, se ha realizado un estudio comparativo de extracción enzimática con los tres tipos de ST, bajo las condiciones óptimas previamente seleccionadas. Los resultados alcanzados muestran que el perfil de compuestos fenólicos en los extractos fue distinto según el tipo de ST utilizado y también, cuando se aplicó la ultrasonificación. Los resultados indican que el ácido ferúlico y ácido gálico son los compuestos fenólicos principalmente extraídos del ST de cuarta y de hoja, resultando el ácido portocatóico y el ferúlico los mayoritarios para el ST de tercerilla. Una ultrafiltración de los extractos con membranas de 3-100 kDa fue también evaluada como proceso de separación/concentración.

Palabras clave: Salvado de trigo; Compuestos fenólicos; Extracción enzimática; Ultrasonificación.

1. INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los principales cereales producidos en el mundo que pertenece a la familia de las gramíneas (gramineae). El fruto o grano que produce se denomina cariósipide y presenta un alto contenido en almidón, proteínas, vitaminas y minerales [1,2]. El grano de trigo está formado por el germen, el endospermo o capa que rodea al germen y una capa externa que rodea al endospermo compuesta por la aleurona, la hialina, la testa, y el pericarpio (epicarpio, mesocarpio y endocarpio) [2,3]. Durante el proceso de molienda esta capa externa del grano, denominada **salvado de trigo** (ST), se separa del germen y del endospermo [4], siendo el ST uno de los subproductos mayoritarios de la industria de molienda de trigo, produciéndose aproximadamente 140-190 g por cada kilogramo de grano de trigo tratado [1]. Hoy en día, el ST se destina a la alimentación animal, pero su utilización para el consumo humano está aumentando gradualmente recibiendo más atención en alimentos horneados y recientemente en aperitivos de cereales fritos (snacks), como aditivo para la reducción de aceite y enriquecimiento en fibra [3].

En cuanto a su composición, el ST presenta un elevado contenido en fibra, minerales como calcio y magnesio, vitaminas del grupo B, proteínas clasificadas como albúminas, globulinas, gliadinas y gluteninas, compuestos fenólicos, y otras sustancias bioactivas [3,5-8], que permiten considerar a dicho subproducto como un sustrato valorizable desde el punto de vista económico y medioambiental.

Los **compuestos fenólicos** o polifenoles (PF) son sustancias bioactivas con elevada funcionalidad que actúan como agentes antioxidantes naturales. Agrupan una gran variedad de moléculas, incluyendo desde compuestos altamente polimerizados hasta moléculas simples con un solo anillo fenólico y un grupo carboxílico en su estructura, como es el caso de los ácidos fenólicos. En el trigo, el mayor contenido de estos ácidos fenólicos se encuentra principalmente en el salvado, con un mayor porcentaje en comparación con el endospermo y germen del cereal [3]. Los ácidos fenólicos que pueden estar presentes en este subproducto se dividen en ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, basados en esqueletos C1-C6 y C3-C6, respectivamente. Los derivados de ácido hidroxibenzoico agrupan a los ácidos p-hidroxibenzoico, vanilínico, siríngico y gálico y los ácidos hidroxicinámicos incluyen a los



ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico [2]. Por lo general, la actividad antioxidante de los ácidos fenólicos es elevada siendo una propiedad de gran importancia para su adición en nuevas formulaciones de alimentos funcionales a base de cereales o subproductos de estos. Además, se están realizando estudios sobre la relación de su ingesta en la salud, siendo posible que modere la posibilidad de padecer diabetes tipo II, obesidad o enfermedades cardiovasculares [2,3]. Por otra parte, el ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) resulta ser uno de los ácidos fenólicos mayoritarios en los salvados de cereales [2] destacando por su elevada capacidad antioxidante, sus propiedades antiinflamatorias y por emplearse en alimentación como precursor de aromas y como aditivo antioxidante [9]. Con lo expuesto, se puede justificar que los PF del ST son un tipo de bioactivos extractables potencialmente interesantes para su aplicación en el desarrollo de preparados farmacéuticos o dietéticos, así como para su incorporación en la elaboración de alimentos funcionales.

Al tratarse de un subproducto sólido, la recuperación de estos compuestos de interés requiere de una operación de extracción sólido-líquido. Esta operación unitaria es ampliamente utilizada en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria para obtener ingredientes naturales (colorantes, saborizantes, entre otros) a partir de materias primas vegetales. Este proceso requiere poner en contacto un disolvente líquido con el sólido para conseguir que se produzca la solubilización de uno o más de los componentes del sólido. Las etapas implicadas en la transferencia del soluto desde el sólido hasta el disolvente incluyen: 1) el cambio de fase del soluto desde la fase sólido hasta el disolvente que rellena los poros del sólido, 2) la difusión del soluto hasta la superficie del sólido a través del disolvente contenido en el poro y 3) la transferencia del soluto en la interfase sólido-líquido, es decir, desde la superficie del sólido hasta seno del disolvente [10].

La **extracción enzimática asistida por ultrasonidos (EEUS)** se presenta como un proceso alternativo a la extracción sólido-líquido convencional debido a que combina el tratamiento enzimático del sustrato vegetal con el efecto de cavitación que provoca la aplicación de una onda ultrasónica. Durante la EEUS, el contacto entre las fases sólido-enzima y disolvente se realiza bajo la acción de una onda ultrasónica, resultando más eficiente como consecuencia del fenómeno de cavitación. Este fenómeno consiste en que la onda ultrasónica genera fluctuaciones de presión dentro de la fase disolvente, las cuales provocan la formación de microburbujas. La oscilación y el colapso de las microburbujas durante la operación de extracción generan una alta turbulencia (o agitación) en el seno del disolvente y la presencia de microburbujas combinado con presiones y temperaturas locales altas provocan un efecto de cizalla sobre el sólido, es decir, se producen pequeñas lesiones en la pared celular o de la membrana celular, de modo que el material más intracelular está disponible. Por lo tanto, la onda sónica aumenta la agitación entre las fases, la porosidad del sólido y la permeabilidad de la pared celular, permitiendo una mejor penetración del disolvente en el poro del sólido, y disminuyendo la resistencia a la difusión del soluto a través de la interfase sólido-líquido [11].

Las enzimas, caracterizadas por presentar un alto grado de especificidad debido a la complementariedad estructural, actúan como biocatalizadores aumentando la velocidad de las reacciones químicas. Estas biomoléculas presentan un centro activo mediante el cual interactúan con la(s) molécula(s) del ligando, recibiendo el nombre de sustrato(s) a través de un acoplamiento espacial y químico definiéndose la catálisis enzimática como la combinación transitoria de la enzima con el sustrato para formar el complejo enzima-sustrato alcanzándose más fácilmente el estado de transición. El principio básico de la extracción enzimática es la ruptura de la pared celular al hidrolizarla empleando una enzima como catalizador, con el fin de liberar los componentes intracelulares. La pared celular se une al centro activo de la enzima, suponiendo una interacción máxima entre los dos que conduce a la ruptura de los enlaces de la pared celular, liberando así los constituyentes activos de la misma [11]. Desde el punto de vista bioquímico, la pared celular de los vegetales se encuentra compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina junto con pequeñas cantidades de pectina, ceniza y proteínas, siendo una barrera para la liberación de sustancias intracelulares [11,12]. Generalmente, en matrices vegetales se suelen emplear enzimas como celulasa, xilanasas y proteasa con la finalidad de degradar la estructura de la pared celular para aumentar su permeabilidad [11,13,14], mejorar la distribución del disolvente, reducir el tamaño de las



partículas, mejorar la velocidad de transferencia del sólido, conllevando así a una mejor y acelerada liberación de biomoléculas intracelulares [14]. Desde un punto de vista más concreto, la celulasa actúa hidrolizando el enlace β -1,4 de la celulosa formándose múltiples monómeros de glucosa [9,15], la xilanasa se caracteriza por participar en la degradación de la hemicelulosa [9,16] y la proteasa presenta capacidad proteolítica actuando sobre las proteínas degradándolas a moléculas más simples, es decir, todas ellas actúan de manera sinérgica para degradar el material lignocelulósico. Resulta de interés la consideración de la propiedad catalítica de la enzima, el modo de operación, las condiciones de proceso óptimas (pH, temperatura, entre otras) así como qué enzima o combinación de enzimas es apropiada para el material vegetal a tratar [13].

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue estudiar la extracción de compuestos fenólicos de distintos tipos de salvado de trigo utilizando un proceso combinado de extracción enzimática y ultrasonificación, así como la caracterización de los extractos obtenidos bajo diferentes condiciones de operación. Este objetivo general se ha desarrollado tratando de cubrir los siguientes objetivos secundarios:

1. Evaluar la viabilidad técnica de un proceso de extracción enzimática para la recuperación eficiente de compuestos fenólicos del salvado de trigo. Estudio del efecto del tipo de enzima, de la proporción enzima/salvado y de la temperatura en la extracción.
2. Optimización basada en la metodología de superficie de respuesta para determinar la proporción relativa de celulasa, proteasa y xilanasa en la mezcla.
3. Estudio comparativo de la extracción enzimática en baños agitados (EEB) con la asistida por ultrasonidos (EEUS). Modelización de los resultados para el cálculo de los coeficientes cinéticos de extracción para distintos tipos de ST.
4. Caracterización de los extractos finales obtenidos bajo las condiciones óptimas de extracción con distintos tipos de salvados de trigo. Identificación y cuantificación de los principales tipos de compuestos fenólicos presentes en los extractos y su separación y/o concentración por ultrafiltración.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES

En este estudio se ha empleado salvado de trigo de tres tipos de granulometría (hoja, cuarta y tercerilla) proporcionado por la empresa Emilio Esteban S. A. Durante la experimentación se empleó agua destilada, ácido clorhídrico (HCl, 0,1N, VWR Chemicals, pureza 37%), acetato sódico anhidro (CH₃COONa, Probus, pureza >99%), ácido acético glacial (CH₃COOH, Panreac Química, pureza >99%) además de una serie de enzimas: celulasa (Cellulase from *Aspergillus niger*, Sigma), xilanasa (Xylanase from *Trichoderma longibrachiatum*, Biocom) y proteasa (Protease from *Bacillus Subtilis* P, Biocom). El ácido gálico y otros compuestos fenólicos utilizados como patrones en las curvas de calibrado fueron suministrados por Sigma-Aldrich con una pureza mayor del 99%.

En las determinaciones analíticas se emplearon los siguientes reactivos químicos: Folin Ciocalteu's reagent (VWR Chemicals), carbonato sódico (Na₂CO₃, Honeywell Fluka, pureza 99,5%), 2,4,6-tris.2-piridil-s-triazine (TPTZ, Sigma-Aldrich), Cloruro de hierro (III) (FeCl₃, Merck Millipore, pureza >98%), Sulfato de hierro (II) (FeSO₄, Merck Millipore), agua Mili-Q, DCTM protein assay reagent A (Bio-Rad), DCTM protein assay reagent B (Bio-Rad), seroalbúmina bovina (BSA, VWR Chemicals, pureza >97%), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl (Trolox, Sigma-Aldrich) metanol (H₃COH, VWR Chemicals, pureza >99,9%) y 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma-Aldrich).



3.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN: PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS ANALÍTICOS

Todos los experimentos de extracción se realizaron poniendo en contacto $10,0 \pm 0,1$ g (balanza Sartorius BA1105, $\pm 0,0001$ g) de los distintos salvados (Fig. 1) con 100 mL de disolvente. El disolvente utilizado en los distintos experimentos fue: agua, tampón acetato a $\text{pH } 5,0 \pm 0,1$ (preparado a partir de ácido acético glacial y acetato sódico anhidro), una disolución ácido clorhídrico a $\text{pH } 5,0 \pm 0,1$ y distintas disoluciones de celulasa, proteasa y xilanasa, así como de sus mezclas, en agua o tampón acetato.



Figura 1. Fotografía del salvado de trigo (a) de hoja, (b) de cuarta, (c) de tercerilla utilizados en este trabajo.

En los **experimentos en baños agitados**, las muestras preparadas (ST + disolvente) se mantuvieron en contacto con agitación orbital o de vaivén (P SELECTA UNITRONIC-OR) a $70,0 \pm 0,1$ rpm durante un periodo de tiempo de 24-28 h a temperatura constante de 40 y 60 °C. Se tomaron muestras a distintos tiempos del proceso. Las muestras se inactivaron sometiéndolas a una temperatura de 95-100 °C durante 2 min y se centrifugaron (microcentrífuga Thermo Scientific Legend Micro 17R) a temperatura ambiente con una velocidad de 13 rpm durante 10 min para conseguir la separación de las fases. Posteriormente, el sobrenadante o extracto se analizó para evaluar el grado de extracción de PF alcanzado.

Para los experimentos de **extracción asistida por ultrasonidos** se empleó un homogeneizador de ultrasonidos (Vibra-Cell VCX 500, Sonics & Materials Inc, USA, Fig. 2a) equipado con una sonda de 13 mm de diámetro (Fig. 2b), operando al 100 % de amplitud.

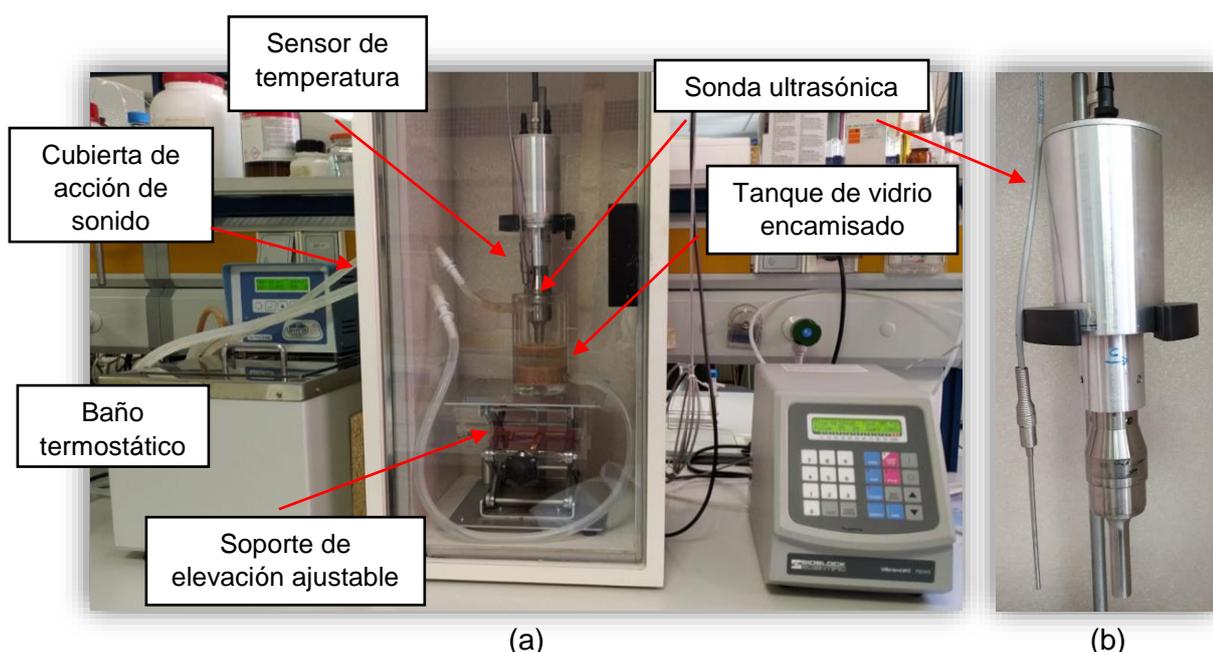


Figura 2. Fotografía (a) del dispositivo experimental y (b) de la sonda utilizada en este trabajo para los experimentos de extracción asistida por ultrasonidos



El procedimiento experimental consistió en la ultrasonificación de las muestras preparadas (ST + disolvente) durante un tiempo máximo de 20-90 min, con ciclos de funcionamiento alterno de 5 s (ciclos de 5 s ON y 5 s OFF) para evitar el calentamiento de la muestra. Como en los experimentos en baños agitados, se tomaron muestras a distintos tiempos de ultrasonificación y seguidamente, se sometieron al mismo protocolo de inactivación y centrifugación. El sobrenadante obtenido fue analizado para evaluar el grado de extracción de PF alcanzado.

Para la concentración/separación de los distintos tipos de PF obtenidos en los extractos se empleó un proceso de ultrafiltración centrífuga utilizando unidades de membrana Amicon (Millipore Amicon™ Ultra-4) de acetato de celulosa regenerada con diferentes cortes moleculares (3, 10 y 100 kDa). Estas unidades de membrana presentan carcasa de estireno/butadieno y revestimiento y tapones de polipropileno con una capacidad volumétrica máxima de 4 mL. Las muestras obtenidas tanto de retenido como de permeado fueron analizadas.

3.2.1 MÉTODOS ANALÍTICOS

Todas las medidas se realizaron por triplicado para cada una de las muestras analizadas. Se expone, a continuación, los distintos métodos analíticos utilizados en este trabajo.

La **determinación de la humedad** de cada tipo de ST se llevó a cabo tratando los sustratos vegetales térmicamente (estufa Thermo Scientific Heratherm Oven) a 80 °C durante un periodo de tiempo de 24 h.

La **cantidad de PF totales** en los extractos, permeados y retenidos se determinó empleando el ensayo Folin-Ciocalteu de acuerdo con el procedimiento descrito por Singleton y Rossi [17] con ligeras modificaciones. Se fundamenta en una reacción de óxido-reducción entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Para este análisis, se tomaron muestras de 100 µL del extracto acuoso que se mezclaron con 2,8 mL de agua destilada, 100 µL de reactivo Folin-Ciocalteu y con 2 mL de carbonato de sodio 7,5% (p/v), preparado a partir de carbonato sódico y agua destilada. La mezcla se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad, durante 1 h y se midió su absorbancia a 750 nm utilizando un espectrofotómetro JASCO V-750 UV-Visible de doble haz y cubetas de sílice de cuarzo (Hellma Analytics). La recta de calibrado se determinó utilizando ácido gálico como ácido fenólico patrón.

La **identificación y cuantificación de los principales tipos de PF** presentes en los extractos, permeados y retenidos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia utilizando un HPLC-DAD Agilent 1110. Se utilizó una columna Kinetex® 5 µm Biphenyl 100 Å 250 x 4,6 mm, una fase móvil A de acetato amónico 5 mM en agua milli-Q con 1 % de ácido acético y una fase móvil B de acetato amónico 5 mM en acetonitrilo con 1 % de ácido acético. Se utilizó un gradiente de fase móvil que fue desde el 98 % fase A:2 % fase B hasta 20 % fase A:80 % fase B durante los 70 min del análisis. El flujo de la fase móvil fue de 0,8 mL/min, la temperatura de operación de 25 °C y longitud de onda de 280 nm y 330 nm. Todas las muestras se filtraron con filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 µm antes de ser inyectadas en la *loop* de HPLC. Los picos se identificaron por el tiempo de retención de los compuestos fenólicos estándares comerciales. Por ello, inicialmente se llevaron a cabo curvas de calibrado para aquellos compuestos fenólicos característicos de cereales como el ácido gálico, el protocatéquico, el ferúlico, el vanilínico, entre otros.

La **actividad antioxidante** de los extractos, permeados y retenidos se determinó utilizando el método FRAP y el método DPPH. El ensayo FRAP se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Benzie y Strain [18] con ligeras modificaciones. Es un método basado en una reacción de transferencia de un electrón entre un antioxidante y el radical libre, se valora la capacidad reductora del antioxidante [19]. Para este análisis, se mezclaron 150 µL del extracto acuoso con 2,85 mL de reactivo TPTZ. El reactivo TPTZ se preparó mezclando 25 mL de tampón acetato sódico a pH 3,6 (preparado a partir de acetato de sodio 0,3 M y ácido acético 0,3 M) con 2,5 mL de FeCl₃ 20 mM (preparado a partir de FeCl₃ y agua Mili-Q), 2,5 mL de TPTZ 10 mM (preparado a partir de TPTZ y HCl 40 mM) y 3 mL agua Mili-Q. La mezcla extracto + reactivo se incubó en un baño termostático (Mettler) a 37 °C durante 30 min y se midió por espectrofotometría (espectrofotómetro JASCO V-750 UV-Visible) la absorbancia a



593 nm. La recta de calibrado se determinó utilizando distintas disoluciones de sulfato de hierro (II) en agua Mili-Q.

La actividad de captación de radicales DPPH se determinó de acuerdo con el método descrito por Bran-Williams et al. [19] con ligeras modificaciones. Se basa en la reacción con un radical libre (DPPH) en una solución de metanol. En este análisis, se mezclan 60 µL del extracto acuoso con 2,94 mL de reactivo DPPH. El reactivo DPPH 50,7 µM se preparó disolviendo 0,001 g del reactivo en 50 mL de metanol, y se debe conservar en oscuridad durante 4 h antes de ser empleado. La mezcla (muestra + reactivo DPPH) se homogenizó, se incubó en oscuridad durante 60 min y se midió por espectrofotometría (espectrofotómetro JASCO V-750 UV-Visible) la absorbancia a 515 nm. La recta de calibrado se determinó utilizando Trolox como antioxidante patrón.

El **pH** de todas las disoluciones acuosas se midió con un pH-metro GLP 22 CRISON de sobremesa, el cual tiene un electrodo de pH del tipo 50-02 para medios acuosos y un error de medida de ± 0,01 unidades de pH.

3.3 SELECCIÓN DE LA FRACCIÓN DE CELULASA, PROTEASA Y XILANASA EN LA MEZCLA

Para optimizar las condiciones de la mezcla de enzimas a utilizar en el proceso de extracción enzimática se ha llevado a cabo un diseño Box-Behnken (BB), un tipo de diseño de superficie de respuesta que permite la optimización de las variables de estudio. Se realizaron 15 ensayos de extracción de acuerdo con un diseño de experimentos BB, a través de la combinación de tres niveles de cada factor independiente. En la Tabla 1, se muestran los rangos experimentales y los niveles de cada uno de los factores independientes, codificados como -1 (bajo), 0 (punto central) y 1 (alto). Estos 15 ensayos de extracción se realizaron con ST de cuarta, poniendo en contacto 10,0 ± 0,1 g ST con 100 mL de tampón acetado a pH 5 (que contiene a la/s enzima/s), en baños agitados a 70,0 ± 0,1 rpm durante 24 h a temperatura constante de 40 °C. Se tomaron muestras a dos tiempos, 20 min y 24 h, se inactivaron, centrifugaron y analizaron siguiendo los mismos protocolos y métodos analíticos descritos en el apartado 3.2.

Tabla 1. Variables, factores y niveles del diseño de experimentos

Variables	Factores	Niveles del ensayo		
		-1	0	1
Celulasa	X _{Cel} (%)	0	0,75	1,5
Xilanasa	X _{Xil} (%)	0	0,75	1,5
Proteasa	X _{Prot} (%)	0	0,75	1,5

El factor de respuesta que se ha seleccionado es el grado de extracción de PF totales expresado en unidades de mg PF/g ST. Los resultados que se han obtenido se han analizado utilizando el coeficiente de correlación (R^2), el análisis de varianza de Pareto (ANOVA), la prueba de la t Student y los gráficos estadísticos y de superficie de respuesta. Se ha utilizado un método de regresión no lineal para ajustar el polinomio de segundo orden (Ec. 1) a los datos experimentales del factor de respuesta e identificar los términos relevantes del modelo. Teniendo en cuenta todos los términos lineales, términos cuadrados y el producto de los términos lineales, el modelo de respuesta cuadrática se puede expresar como:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum \beta_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + \varepsilon \quad (1)$$

donde, β_0 es el término de desplazamiento, β_i es la pendiente o efecto lineal, β_{ii} es el efecto cuadrático, β_{ij} es el efecto lineal de interacción lineal entre los factores independientes x_i y x_j y ε es el error medio [20,21].



4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de estudiar el proceso de extracción enzimática de PF de distintos tipos de ST se ha examinado el efecto de una serie de variables que influyen directamente sobre él. Estas variables son: la aplicación de ultrasonicación, la temperatura, la adición de distintos tipos de enzimas como biocatalizadores y el uso de agua o tampón acetato a pH 5 como disolvente. Toda la primera fase experimental se realizó utilizando ST de cuarta y posteriormente, se ha trabajado con ST de hoja y de tercerilla bajo las condiciones óptimas de extracción enzimática seleccionadas experimentalmente para el ST de cuarta.

La elección del intervalo de temperatura a estudiar en este trabajo está influenciada por la revisión bibliografía realizada [14, 22]. Hay estudios que demuestran que el efecto de la temperatura en los procesos de extracción de PF de sustratos vegetales mejora al aplicar temperaturas entre 40 y 80 °C [14]. La temperatura óptima depende de la matriz del producto vegetal y, se conoce que los PF presentan interacciones con los componentes de las fibras [14]. Una temperatura de extracción superior a 60 °C puede originar la aparición de compuestos de degradación de los posibles componentes termolábiles presentes en el sólido, además de un gasto energético demasiado alto [14]. Con lo expuesto, se seleccionó para este estudio con ST un intervalo de temperaturas comprendido entre 40 °C y 60 °C.

4.1 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN CON AGUA Y DE EXTRACCIÓN ÁCIDA A pH 5

En la Figs. 3 se representan los resultados de las cinéticas de extracción de PF del ST de cuarta realizados para estudiar el efecto de la temperatura (40-60 °C), de la ultrasonicación (US) y del uso de diferentes disolventes: agua destilada (W, pH 6,5), tampón acetato a pH 5,0 (T) o una disolución de ácido clorhídrico a pH 5 (HCl). En esta figura se observa que la velocidad de extracción de PF del ST es más rápida, obteniéndose una mayor cantidad de PF recuperados a lo largo del tiempo, al aumentar la temperatura de 40 a 60 °C, en la extracción ácida y bajo el efecto del fenómeno de cavitación que genera la onda ultrasónica en la fase líquida. Este resultado puede deberse a que un de incremento de temperatura aumenta la solubilidad de los PF en el agua y el ablandamiento del tejido del ST [14,22], que un medio débilmente ácido (como pH 5) se produce una hidrólisis parcial de la pared celular que facilita la transferencia de materia desde el sólido al disolvente [23,24] y que el fenómeno de cavitación provoca lesiones graves sobre la pared celular [23,24] o incluso la rotura de la partícula de sólido. Para comprobar el efecto, se observó la morfología del ST antes y después del proceso de extracción ultrasónica utilizando un microscopio detector de barrido de electrones JEOL JSM-6460LV con rayos X dispersores de energía (JEOL Ltd. Japón), disponible en el I+D+i de la Universidad de Burgos. Las partículas de ST presentaron una reducción considerable de tamaño después del proceso de US como se observa en la Fig. 4.

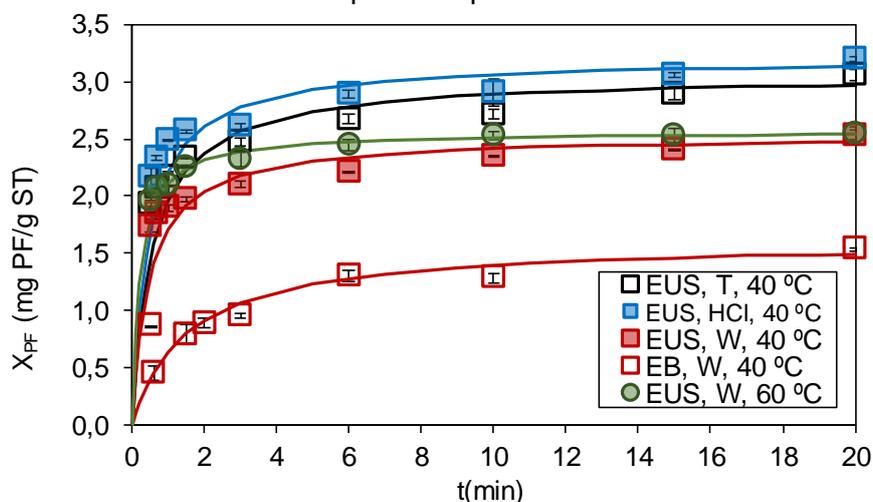


Figura 3. Resultados de las cinéticas de extracción de PF de ST de cuarta utilizando distintos disolventes (T a pH 5, HCl a pH 5 o W a pH 6,5) y temperaturas (40 o 60 °C) para un proceso de extracción en baños agitados (EB) o por ultrasonicación (EUS). Datos experimentales: símbolos. Datos calculados con la Ec. 3: líneas.

Por otra parte, la comparación de los resultados de las cinéticas a pH 5 con las de agua (Fig. 3) muestra que el valor de X_{PF} a lo largo del tiempo es ligeramente superior al acidificar con un ácido fuerte como el HCl. Este resultado puede deberse a que el HCl es un ácido fuerte, el cual parece presentar un poder hidrolizante mayor sobre el ST que el ácido acético. Con lo expuesto, para experimentaciones posteriores en condiciones óptimas se ha optado, pese a las diferencias que muestra, por el uso de tampón acetato como disolvente adquiriendo así con extracto final más limpio.

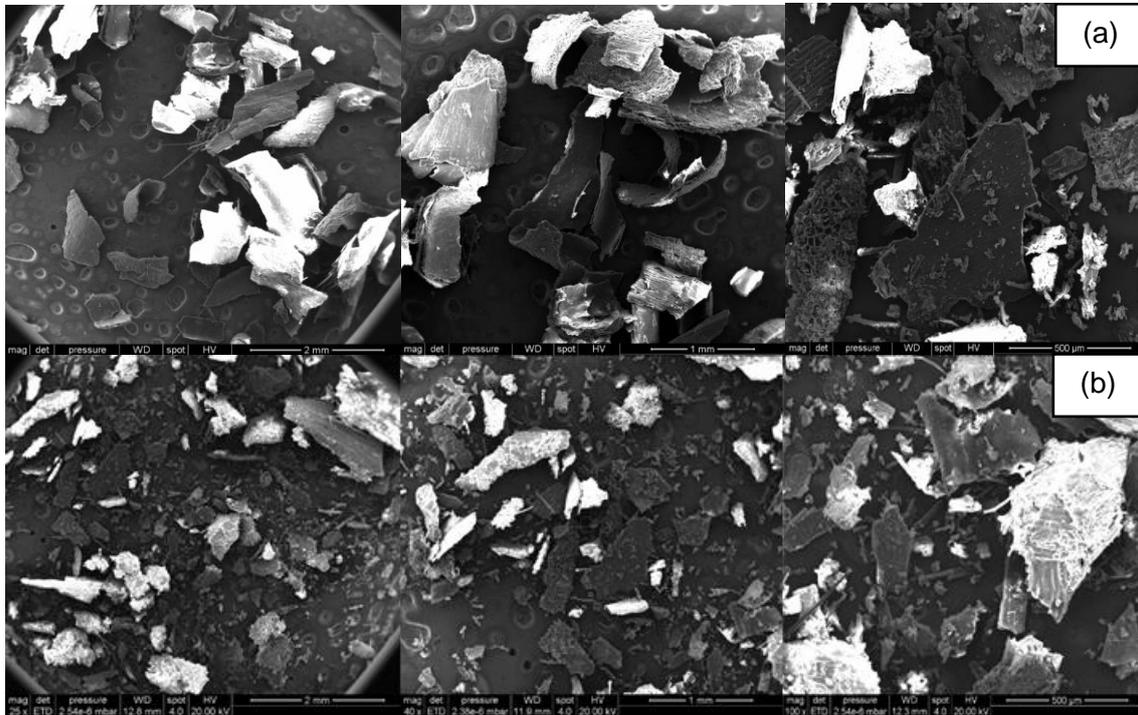


Figura 4. Imágenes SEM de ST seco (a) antes y (b) después del proceso de extracción por ultrasonificación con ampliación x25, x40 y x100.

4.1.1 ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES CINÉTICOS DE EXTRACCIÓN. COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados de las cinéticas de extracción de bioactivos a partir de sustratos vegetales pueden ser evaluadas y comparadas utilizando un modelo potencial de segundo orden [25,26]:

$$\frac{dX}{dt} = k(X_{PF\infty} - X_{PF})^2 \quad (2)$$

A partir de la integración de la Ec. 2, bajo los límites de integración $X_{PF}=0$ para $t=0$ y X_{PF} para cualquier tiempo t , se obtiene la Ec. 3. Esta ecuación se puede utilizar para predecir el valor de X_{PF} a cualquier tiempo de operación.

$$X_{PF} = \frac{hX_{PF\infty}t}{X_{PF\infty} + ht} \quad (3)$$

y la forma lineal de la Ec. 3 se muestra en la Ec. 4:

$$\frac{t}{X_{PF}} = \frac{1}{X_{PF\infty}}t + \frac{1}{h} \quad (4)$$

donde, k representa la constante cinética del proceso de extracción, $h = kX_{PF\infty}^2$ es la velocidad inicial de extracción de PF, $X_{PF\infty}$ es la fracción en peso de PF liberados en la saturación o en el estado estacionario y X_{PF} es la fracción en peso de PF extraída en cualquier tiempo t .

Para el cálculo del coeficiente h y del parámetro $X_{PF\infty}$ se utilizó la forma lineal del modelo, es decir la Ec. 4. En la Fig. 5 se representa t/X_{PF} frente al tiempo t para todos los experimentos de la Fig. 3, observándose que todos ellos presentan un buen comportamiento lineal con un coeficiente $R^2 > 0,99$ (ver Tabla 2). A partir del valor de la pendiente se calculó $X_{PF\infty}$ (es el



inverso de la pendiente) y con el valor de la ordenada en el origen se calculó h (es el inverso de la ordenada en el origen). En la Tabla 2 se muestran los resultados de h y $X_{PF\infty}$ para los experimentos de la Fig. 3. Además, en la Fig. 3 se observa que el valor temporal X_{PF} calculado con la Ec. 3 (líneas) predice de manera adecuada los resultados experimentales (símbolos).

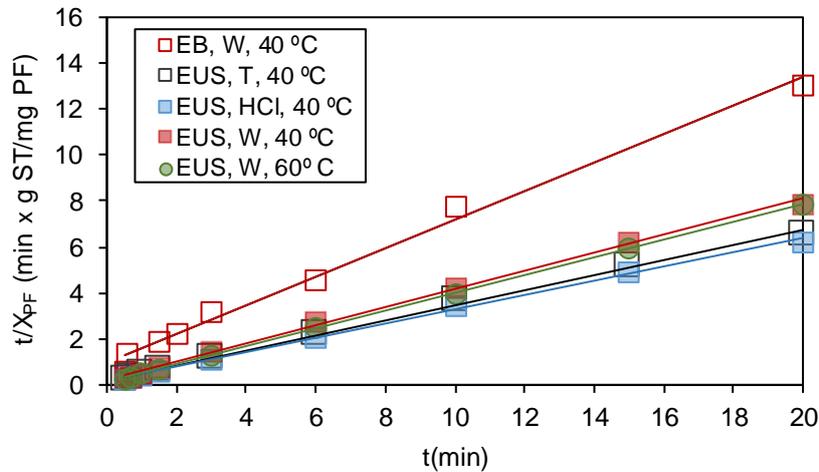


Figura 5. Ajuste lineal de los resultados de los experimentos de la Fig. 3 a la forma lineal del modelo cinético potencial mostrada en la Ec. 3.

Los resultados de la Tabla 2 muestran que h fue unas cinco veces superior en el proceso EUS que el EB, confirmando que el efecto de la cavitación contribuye positivamente en la velocidad de extracción de PF. Además, $X_{PF\infty}$ (concentración de PF extraída en el estado estacionario) adquiere, también, un valor mucho más grande con la tecnología EUS, probablemente debido a la rotura del sólido que permite la extracción de aquellos PF intracelulares. Por otra parte, se observa en la Tabla 2 que h resultó ser el doble al aumentar la temperatura de 40 a 60 °C en la EUS, indicando que la velocidad de extracción está significativamente afectada por este parámetro; sin embargo, no contribuye en el valor de $X_{PF\infty}$, como queda reflejado en la Tabla 2.

Tabla 2. Coeficientes cinéticos calculados con la Ec. 4 para los experimentos cinéticos de la Fig. 3. Disolventes: agua (W), tampón acetato a pH 5 (T) y disolución de ácido clorhídrico a pH 5 (HCl). Tipo de extracción: extracción en baños agitados (EB) y por ultrasonicación (EUS).

Experimento	R ²	h (mg PF/g ST min)	X _{PF∞} (mg PF/g ST)
W, EB, 40 °C	0,991	1,05	1,61
W, E US, 40 °C	0,998	5,30	2,53
W, EUS, 60 °C	0,999	11,82	2,57
T, EUS, 40°C	0,997	5,41	3,06
HCl, EUS, 40 °C	0,993	7,05	3,21

Con respecto a la extracción ácida a pH 5, la velocidad de extracción de PF (h) es ligeramente superior a la obtenida con la experimentación en agua, sin embargo, si se compara el valor en el tiempo de X_{PF} (Fig. 3) y $X_{PF\infty}$ se observa que son superiores, justificando de esta manera que el fenómeno de hidrólisis parcial ácida, al igual que de cavitación, parecen alterar la estructura de la pared celular del ST promoviendo, así, la extracción de PF intracelulares o inaccesibles.

4.2 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN UTILIZANDO CELULASA

Tenido en cuenta la composición de la pared celular que presenta el subproducto en estudio y basándose en la bibliografía revisada [11,14,22], una de las enzimas que se seleccionó fue la celulasa. Como se ha comentado con anterioridad, resulta de suma importancia el conocimiento de las condiciones óptimas de las enzimas para que su uso sea lo más eficaz



posible. En este caso se ha valorado la temperatura y el pH óptimo mostrándose en la Tabla 3 los valores correspondientes para la celulasa [15].

Tabla 3. Valores de temperatura y pH óptimos para celulasa [15].

	Temperatura óptima (°C)	Rango de pH	pH óptimo
Celulasa	40	3-9	4,5 y 7,5

Estos experimentos tienen como objetivo estudiar el efecto de adición de celulasa sobre el proceso de extracción de PF del ST además de comprobar si la enzima sufre inactivación como consecuencia del proceso de ultrasonicación (EUS). La proporción de enzima (g celulasa) con respecto a gramo de ST fue: 1%, 1,5% y 3%. Todas las disoluciones celulasa-agua (1-3%) presentaron un valor de pH de $5,5 \pm 0,2$ estando dentro del intervalo de pH de utilización de esta enzima (Tabla 3).

Las experimentaciones se llevaron a cabo paralelamente y de manera análoga tanto para la tecnología EEUS como la EEB debido al posible efecto de inactivación. Estudios demuestran que temperaturas de operación elevadas provocan la pérdida gradual de la actividad enzimática, siendo características del proceso US las altas temperaturas [11]. Por ello, realizando estas experimentaciones se pretende poder defender la posible inactivación de la celulasa durante el proceso de extracción de PF.

Los resultados de las cinéticas de extracción enzimática en baños agitados (EEB) y por ultrasonicación (EEUS) con diferentes proporciones de celulasa se muestran en la Fig. 6. En la Fig. 6a se observa que la extracción de PF se ve afectada significativamente por la cavitación y por el aumento de celulasa del 1% al 1,5%. No se observaron cambios significativos en la cinética de extracción cuando se aumentó la proporción celulasa/ST desde el 1,5% hasta el 3%. Con este resultado se seleccionó como proporción máxima celulasa/ST el 1,5% debido a que la adición de proporciones muy elevadas de enzima puede producir efectos de inhibición en su poder biocatalítico [11].

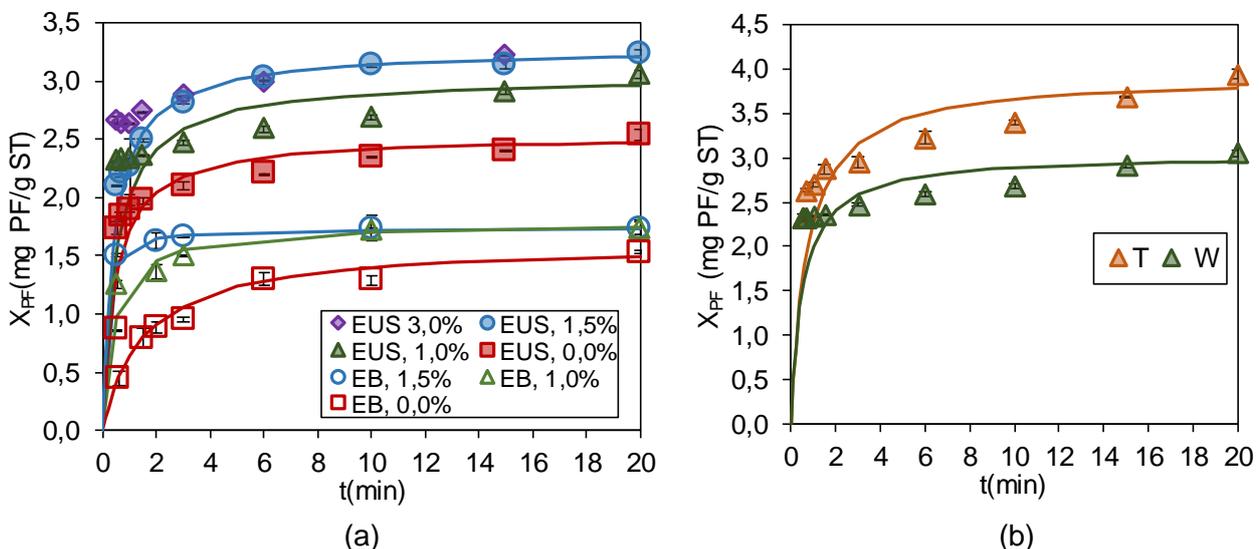


Figura 6. Resultados de las cinéticas de extracción de PF de ST de cuarta a 40 °C para (a) el proceso EEB y EEUS utilizando 0-3% de celulasa y agua como disolvente y para (b) el proceso EEUS utilizando 1% de celulasa y como disolvente agua (W) o tampón acetato (T). Datos experimentales: símbolos. Datos calculados con Ec. 3: líneas.

Además, el alto X_{PF} alcanzado al utilizar distintas concentraciones de celulasa en la EEUS (Fig. 6a) y su valor también superior a la extracción sin celulasa, justifica que el efecto de la cavitación no parece inactivar la actividad biocatalítica (hidrólisis enzimática) de la celulasa sobre la pared celular del ST.

La Fig. 6b muestra que el uso de un tampón acetato a pH 5 para la extracción con celulasa (próximo a su pH óptimo de utilización) mejora la liberación de PF a lo largo del tiempo. Esto se debe a que las condiciones de operación se encuentran más próximas al pH óptimo de



utilización de la celulosa (Tabla 3) suponiendo una actividad enzimática máxima. Además, la presencia de ácido en el medio genera una hidrólisis parcial ácida sobre la pared celular del ST mejorando así la extracción de PF [23,24].

4.3 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN UTILIZANDO PROTEASA Y XILANASA

Además de celulosa y en base a bibliografía, en este estudio se han empleado proteasa y xilanasa [11,14, 22]. Como para celulosa, se ha tenido en cuenta la temperatura y el pH óptimo de estas enzimas que se muestran en la Tabla 4 [16,27,28].

Tabla 4. Valores de temperatura y pH óptimos para proteasa y xilanasa.

	Temperatura óptima (°C)	Rango de pH	pH óptimo
Proteasa [27]	47	5,5-7,5	6,5
Xilanasa [16,28]	50-60	4,0-6,0	4,0-5,0

En la Fig. 7 se representan las cinéticas de extracción de PF de ST de cuarta a 40 °C para el proceso EEUS utilizando 0-3% de proteasa o xilanasa y agua como disolvente. El pH de las disoluciones acuosas de estas enzimas fue de $6,5 \pm 0,1$ para las de proteasa y de $5,0 \pm 0,2$ para las de xilanasa, coincidiendo con el pH óptimo de uso de estas enzimas (Tabla 4). De forma general y como sucedió para el caso de la celulosa, la extracción de PF aumenta significativamente en presencia de proteasa y xilanasa y un aumento desde el 1% hasta el 3% en la fracción de enzima no mejoró el valor de X_{PF} a lo largo del tiempo. Este resultado puede ser justificado al considerar que la xilanasa presenta su máximo de actividad enzimática en concentraciones próximas al 1% [16]. Además, una comparación de resultados entre celulosa (Fig. 6a), proteasa (Fig. 7a) y xilanasa (Fig. 7b) demuestra que el efecto de catálisis enzimática sobre esta matriz vegetal es mayor al utilizar la enzima xilanasa seguida de la proteasa y el efecto es bastante más reducido al emplear celulosa como biocatalizador enzimático.

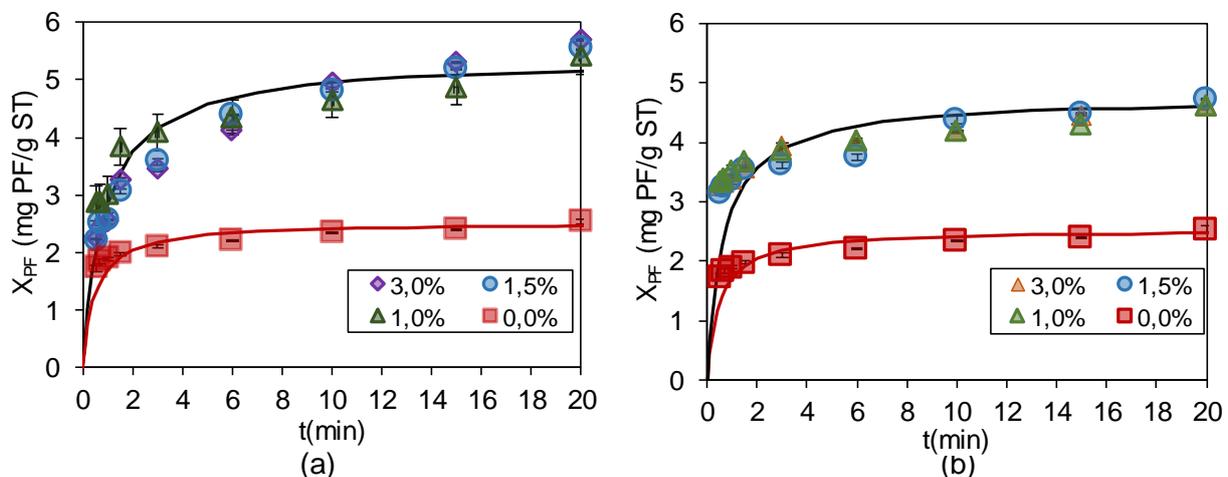


Figura 7. Resultados de las cinéticas de extracción de PF de ST de cuarta a 40°C para el proceso EEUS utilizando 0-3 % de (a) proteasa o (b) xilanasa y como disolvente agua (W). Datos experimentales: símbolos. Datos calculados con Ec. 3: líneas.

A partir de la Ec. 3 obtenida a través del modelo cinético de segundo orden se han determinado el valor de los coeficientes h y $X_{PF\infty}$ correspondientes a las cinéticas de extracción de la Fig. 7. Se obtuvo que todos los ajustes presentaron un valor de R^2 superior a 0,99 observándose en esta figura la buena concordancia existente entre los datos experimentales (símbolos) y los calculados mediante la Ec. 3 (líneas).

Con la finalidad de poder comprobar el efecto del tampón de acetato a pH 5 sobre la extracción enzimática tanto con proteasa como con xilanasa, se realizaron un conjunto de experimentos cinéticos de EEUS a 40 °C, empleando una proporción del 1% de cada enzima y tampón acetato a pH 5 como disolvente. Como resultado se obtuvo que no presentaban diferencias



significativas entre ellos, es decir, no hubo efecto de este disolvente, ni del pH sobre la extracción de PF de ST. Esto puede ser justificado al amplio rango de pH de actuación que presentan las enzimas (Tabla 4). Los datos cinéticos correspondientes a estas experimentaciones fueron exactamente iguales a los expresados en la Fig. 7a y b (datos no mostrados).

4.4 COMPARACIÓN DE LOS COEFICIENTES CINÉTICOS PARA LA EXTRACCIÓN CON CELULASA, PROTEASA O XILANASA.

El coeficiente cinético h permite comparar la velocidad de extracción de PF al utilizar las diferentes enzimas de estudio: celulasa, proteasa y xilanasa. En la Fig. 8a se representa el valor de h , obtenido a partir del modelo cinético de la Ec. 3, para los experimentos de las Figs. 6 y 7. Como se observa, la velocidad de extracción con proteasa fue aproximadamente 1,5 veces más rápida que la extracción con xilanasa no observándose cambio en su valor al aumentar la concentración de estas enzimas desde el 1% hasta el 3%, siendo concordante con los resultados concluidos en el apartado 4.3. Sin embargo, con celulasa la velocidad de extracción crece hasta que en el medio hay una cantidad mínima del 1,5%. Referido a la utilización de tampón acetato a pH 5 como disolvente no se observó modificación en el valor de h para estas tres enzimas indicando que no afecta significativamente a la velocidad de extracción de PF.

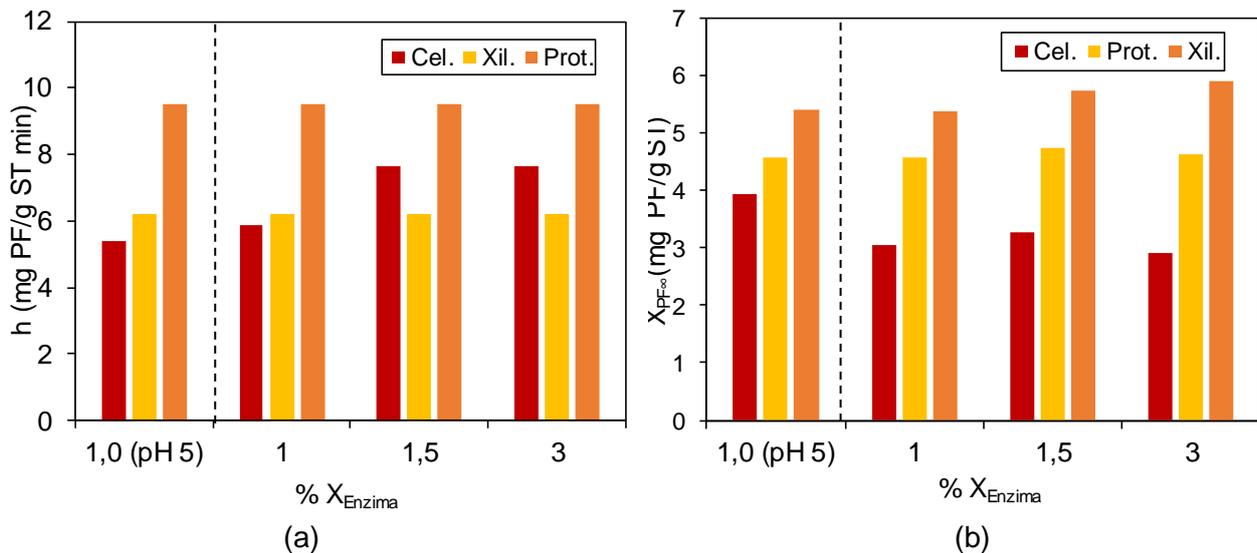


Figura 8. Efecto del tipo de enzima en el valor del (a) coeficiente h y del (b) parámetro $X_{PF\infty}$ para los experimentos de EEUS a 40 °C con agua o tampón acetato a pH 5 de las Figs. 6 y 7.

En cuanto a la concentración de PF en la saturación ($X_{PF\infty}$), el modelo predice, de forma general, una concentración significativamente mayor cuando en el proceso de extracción se ha utilizado xilanasa como puede observarse en la Fig. 8b. Asimismo el empleo de tampón acetato a pH 5 no presentó un efecto marcado sobre dicho parámetro para las experimentaciones con xilanasa o proteasa, sin embargo, para la celulasa se observa un aumento significativo a causa de una modificación del pH del medio a uno más próximo a su pH óptimo de actuación (Tabla 3).

4.5 SELECCIÓN DE LA FRACCIÓN ÓPTIMA DE CELULASA, PROTEASA Y XILANASA

Los 15 experimentos que se llevaron a cabo, de acuerdo con el diseño BB realizado con un paquete informático Statgraphics Centurion XVII (Statistical graph Co., Rockville, MD, USA), para determinar los porcentajes óptimos de celulasa, proteasa y xilanasa a utilizar en el proceso de extracción enzimática se muestran en la Tabla 5.



Tabla 5. Experimentos generados por el diseño Box-Behnken y resultados experimentales obtenidos para la extracción de PF a las 24 h para un proceso EEB.

Experimento	X _{Cel} (%)	X _{Xil} (%)	X _{Prot} (%)	X _{PF} experimental (mg PF/g ST)	X _{PF} predicho con Ec. 5 (mg PF/g ST)
1	0,75	0,75	0,75	5,17	5,28
2	0	0	0,75	4,67	4,69
3	1,5	0	0,75	3,90	3,81
4	0	1,5	0,75	5,71	5,81
5	1,5	1,5	0,75	6,20	6,18
6	0	0,75	0	5,13	5,13
7	1,5	0,75	0	5,93	6,04
8	0,75	0,75	0,75	5,35	5,28
9	0	0,75	1,5	6,75	6,64
10	1,5	0,75	1,5	5,23	5,23
11	0,75	0	0	3,74	3,72
12	0,75	1,5	0	5,66	5,57
13	0,75	0	1,5	4,09	4,18
14	0,75	1,5	1,5	5,80	5,82
15	0,75	0,75	0,75	5,32	5,28

La ecuación polinómica de segundo orden (Ec. 5) que predice el diseño BB para la extracción de PF a las 24 h para el proceso de EEB es:

$$X_{PF} = 3,97 - 0,85 X_{Cel} + 2,27 X_{Xil} + 0,83 X_{Prot} + 0,69 X_{Cel}^2 + 0,56 X_{Cel} X_{Xil} - 1,03 X_{Cel} X_{Prot} - 0,97 X_{Xil}^2 - 0,09 X_{Xil} X_{Prot} + 0,16 X_{Prot}^2 \quad (R^2=0,992) \quad (5)$$

El coeficiente de correlación (R^2) obtenido fue alto, superior a 0,99, indicando la existencia de una buena correlación entre los datos experimentales de X_{PF} y los predichos con la Ec. 5 de diseño BB, que están recogidos en la Tabla 5. En cuanto a los resultados del análisis de varianza mostrados en el diagrama de Pareto (Fig. 9a) reflejan que la mayoría de los efectos lineales, cuadráticos y combinados contribuyen de forma significativa al proceso de extracción de PF, excepto el producto $X_{Xil} X_{Prot}$ y $X_{Prot} X_{Prot}$ que presentan una contribución en la Ec. 5 inferior a 0,2. Además, como se observa en la Ec. 5 y en la Fig. 9a (Diagrama de Pareto), un aumento de la fracción de celulasa, del efecto combinado de la celulasa y proteasa, así como del término cuadrático de la xilanasa contribuyen de manera negativa en la cinética de extracción de PF de ST.

En la Fig.9b se muestra la condición óptima de la fracción de cada enzima: celulasa, proteasa y xilanasa junto con el valor de PF a las 24 h del proceso de extracción predicho por el modelo. Los gráficos de superficie de respuesta tridimensional (Fig. 9c) representan la relación entre el contenido fenólico total del extracto de ST y las variables experimentales ($X_{Cel.}$, $X_{Prot.}$, y $X_{Xil.}$). Estos gráficos muestran la respuesta en función de dos variables y mantienen la otra variable en su nivel medio. Como se observa en la Fig. 9c, de forma generalizada, la adición de xilanasa y proteasa hasta el 1,5% supone un aumento de la cinética de extracción de PF. Sin embargo, el comportamiento de la celulasa es contrario al de las otras dos enzimas, observándose que X_{PF} disminuye al aumentar la cantidad de celulasa en el medio. Esta disminución en el rendimiento de extracción debido a la celulasa es comparable con los resultados ya publicados con salvado de trigo utilizando como disolvente agua y HCl o NaOH para ajustar el pH [29].

Con lo expuesto, el modelo predice que la condición óptima (Fig. 9b) es la mezcla de 0% de celulasa, 1,5% de proteasa y 1,1% de xilanasa para un proceso EEB a 40 °C y utilizando tampón acetato a pH 5 como disolvente. Los resultados de las cinéticas de extracción enzimática en baños agitados y asistida por ultrasonidos bajo esta condición óptima de extracción se representan en la Fig. 10. Estos resultados reflejan que se logra alcanzar el valor de X_{PF} (6,76, 6,67 y 6,93 mg PF/g ST, para el valor óptimo del diseño BB, para el proceso EEB y para el proceso EEUS, respectivamente) predicho por el diseño de experimentos BB en ambos procesos de extracción.

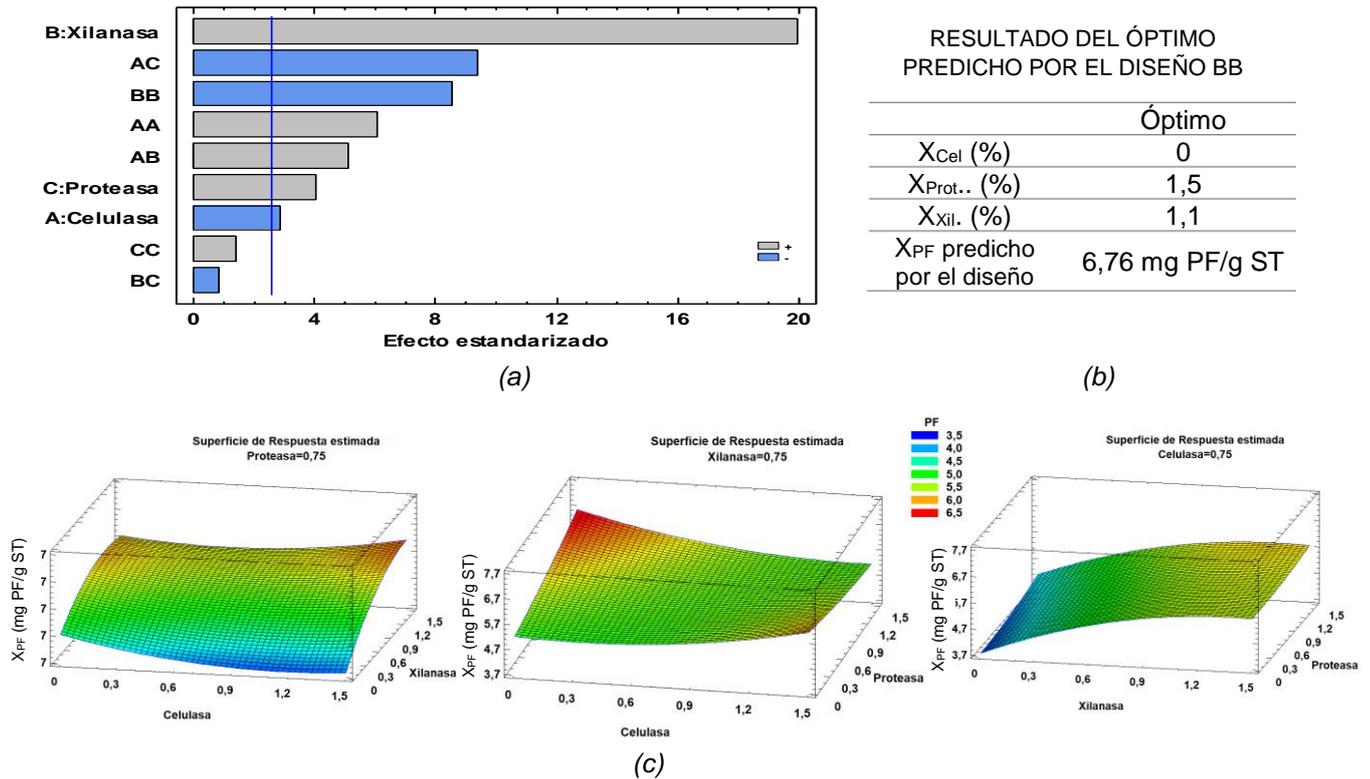


Figura 9. Resultados experimentales del diseño BB. (a) Diagrama de Pareto y (b) condiciones óptimas del porcentaje de cada enzima y (c) fotografía de los gráficos de superficie de respuesta contrastando celulasa, proteasa o xilanasa frente a la extracción de PF.

Como en experimentos anteriores, la velocidad de extracción de PF del ST de cuarta aumentó como consecuencia del fenómeno de cavitación originado por la onda ultrasónica, probablemente debido a las lesiones que provoca este fenómeno sobre la pared celular [23,24]. Como en casos anteriores, los resultados experimentales (símbolos) de la Fig.10 se ajustan adecuadamente al modelo potencial de segundo orden mostrado en la Ec. 3 que se representa como líneas en esta figura. En la Tabla 6 se observa que el coeficiente h es aproximadamente seis veces superior en el proceso EEUS en comparación con el proceso EEB, justificando esta diferencia en h la reducción de tiempos de proceso para obtener una liberación de PF similar a la predicha por el diseño de experimentos.

Tabla 6. Coeficientes cinéticos para los experimentos de la Fig. 10.

Experimento	h (mg PF/g ST min)	X _{PF∞} (mg PF/g ST)	X _{PF} experimental (mg PF/g ST)	R ²
EEUS	2,25	6,92	6,93	0,994
EEB	0,42	6,65	6,67	0,999

En la Fig.10 se observa que el perfil de las curvas de extracción es muy similar para ambos procesos. Sin embargo, se consigue alcanzar el estado estacionario en tiempos mucho menores para el EEUS (siendo aproximadamente 20 h en el EEB y 1,2 h en el EEUS).

Para la identificación y cuantificación de los principales tipos de PF presentes en el extracto se realizó un análisis por HPLC siguiendo el protocolo del apartado 3.2.1. En la Fig. 11 se muestra el perfil de compuestos fenólicos para el extracto final (28 h) del EEB y del extracto final (90 min) del EEUS de los experimentos de la Fig. 10.

Como se observa en la Fig. 11 a lo largo del proceso de extracción se han liberado una serie de PF al medio: ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanilínico y aldehído siríngico. De forma general, para estos dos experimentos el ácido ferúlico destaca por ser el mayoritario [2,] seguido del ácido gálico. Sin embargo, en el proceso EEB no se observa la presencia de ácido p-hidroxibenzoico, es decir, el fenómeno de cavitación



promueve la extracción de más tipos de PF, dando como resultado un extracto final con mayor cantidad de polifenoles totales (6,67 y 6,93 mg PF/g ST para EEB y EEUS, respectivamente). En ambos casos el perfil de PF identificados se corresponde con los perfiles comúnmente encontrados en cereales y salvados [14,23].

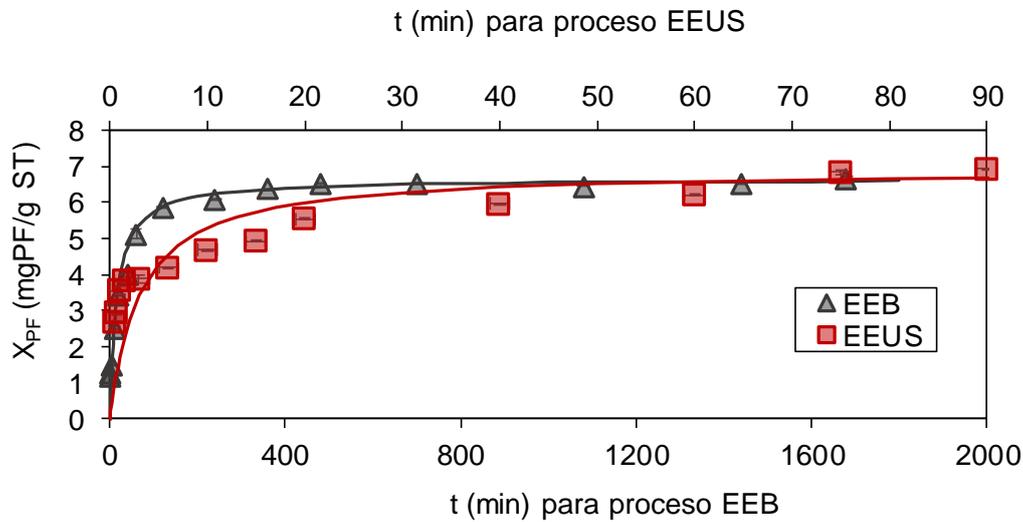


Figura 10. Comparación de las cinéticas de extracción del PF de ST de cuarta a 40 °C para un proceso EEB y EEUS bajo las condiciones óptimas predichas a través del diseño de experimentos Box-Behnken (1,1% de xilanasa y 1,5% de proteasa disueltas en tampón acetato). Datos experimentales: símbolos. Datos calculados con Ec. 3: líneas.

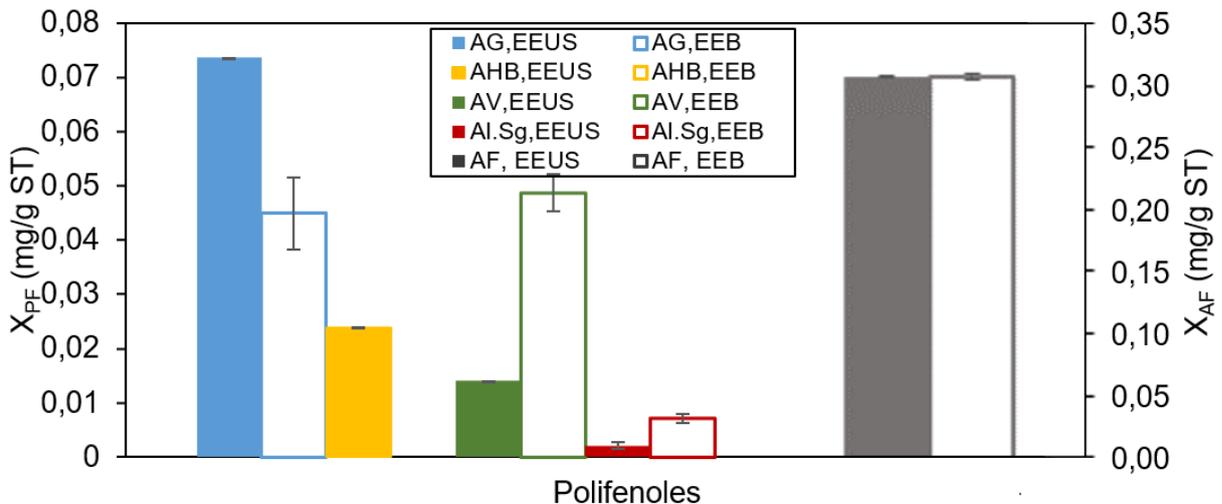


Figura 11. Perfil de compuestos fenólicos para el extracto final (28 h) del EEB y para el extracto final (90 min) del EEUS de los experimentos de la Fig. 10. Los polifenoles identificados fueron: ácido gálico (AG), ácido p-hidroxibenzoico (AHB), ácido vanilínico (AV), aldehído siríngico (Al.Sg) y ácido ferúlico (AF).

Además, con la finalidad de analizar el proceso de concentración-separación de distintos tipos de PF presentes en el extracto obtenido en el proceso EEB, se ha ultrafiltrado con membranas de 100, 10 y 3 KDa. No hubo diferencias significativas en el grado de retención de PF al utilizar membranas de acetato de celulosa regenerada con cortes moleculares comprendidos entre 100 y 3 KDa. Los resultados de la concentración de PF en el retenido y el permeado se recogen en la Tabla 8. El proceso de ultrafiltración ha permitido obtener una fase de retenido que presenta una concentración de 10,51 mg PF/g ST (973,12 mg PF/L) frente al 6,67 mg PF/g ST que presentaba el extracto EEB. Analizando el perfil de PF se observa que con este proceso de ultrafiltración se ha conseguido concentrar el extracto siendo ahora mucho más rico en ácido gálico, ferúlico y p-hidroxibenzoico.



4.6 RESULTADOS DE EXTRACCIÓN CON DISTINTOS TIPOS DE SALVADO DE TRIGO

En la Fig. 12 se presenta el efecto del tipo de salvado de trigo (hoja, cuarta y tercerilla) sobre la cinética de extracción de PF bajo las condiciones óptimas de operación seleccionadas anteriormente. La extracción fue más rápida al utilizar salvado de trigo de hoja y significativamente mucho más lenta con el ST de tercerilla. Además, los extractos a las 28 h mostraron un valor de PF de 5,88, 6,77 y 7,48 mg PF/g ST para el ST de tercerilla, cuarta y hoja, respectivamente (Tabla 7). Esta diferencia en PF modifica de manera significativa la capacidad antioxidante, con un efecto muy marcado en la capacidad reductora (FRAP) de los extractos como se puede observar en la Tabla 7.

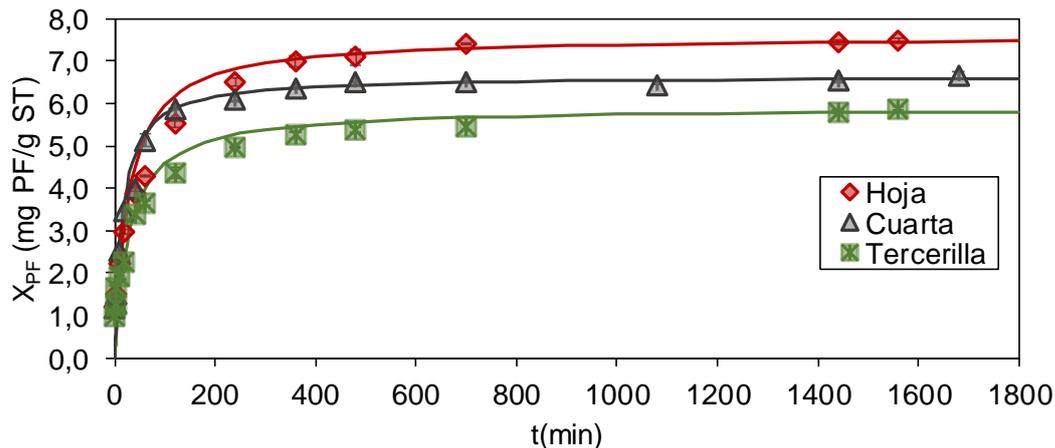


Figura 12. Efecto del tipo de salvado de trigo sobre la cinética de extracción de PF bajo las condiciones óptimas de operación seleccionadas anteriormente. Datos experimentales: símbolos. Datos calculados con Ec. 3: líneas.

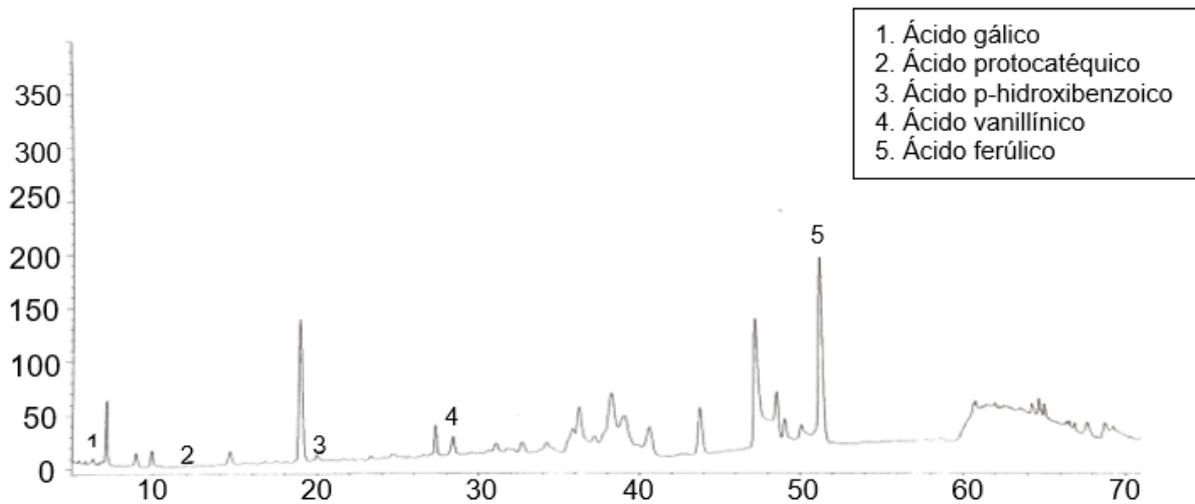
La granulometría es uno de los factores que puede influir sobre la cinética de extracción [30] y repercutir en la actividad antioxidante del extracto final. Por lo general, se suele necesitar una reducción de tamaño para conseguir mejorar la extracción de PF [4,1,13,31]. En este trabajo no se ha modificado el tamaño de partícula de ninguno de los ST utilizados.

Tabla 7. Resultados de PF y actividad antioxidante para los diferentes ST estudiados.

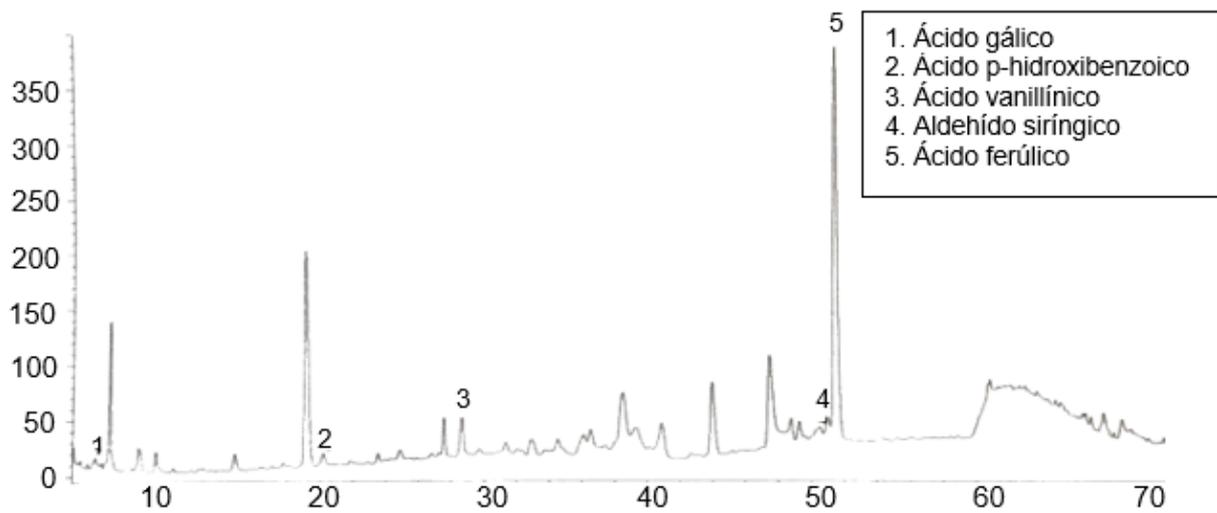
Tipo ST	PF (mg PF/g ST)	FRAP ([FeSO ₄] mM/g ST)	DPPH (mg/ml)
Hoja	7,48 ± 0,06	72,22 ± 0,42	62,81 ± 0,50
Cuarta	6,67 ± 0,06	53,29 ± 0,84	64,23 ± 0,18
Tercerilla	5,88 ± 0,04	59,27 ± 1,92	62,78 ± 0,18

En la Fig. 13 se muestra el perfil de PF para los extractos correspondientes a cada tipo de ST estudiado. El análisis HPLC de la fase acuosa reflejó la presencia de ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanilínico, ácido siríngico, aldehído siríngico y ácido ferúlico junto con otros, siendo picos no identificados por el equipo HPLC. En la tabla 8 se muestra la cuantificación de cada uno de los PF identificados determinada a partir de rectas de calibrado.

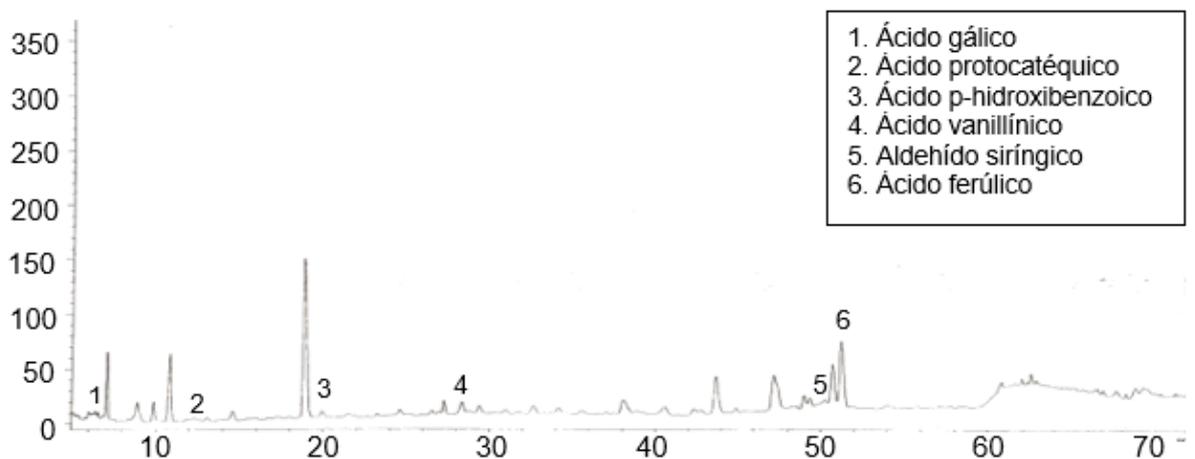
Analizado los valores obtenidos en al Fig. 13 y Tabla 8, se concluye que el ácido ferúlico se considera el componente principal en el salvado de trigo [2,31] siendo mayoritario en presencia de una granulometría intermedia (cuarta). Como constituyentes menores presentes en todos los tipos de ST se han identificado el ácido gálico y el ácido vanilínico. El de hoja y el de tercerilla, además, destacan por presentar el ácido protocatéquico y el ácido p-hidroxibenzoico. Y el aldehído siríngico se encuentra presente en la ST de cuarta y con un valor muy inferior en el ST de tercerilla. Con lo expuesto, se justifica la influencia del tamaño de granulometría sobre la composición del extracto final. Así mismo, estas cinéticas de extracción de PF correspondientes a la Fig.12 se han analizado con más detalle a lo largo del tiempo de operación (Fig. 14 y 15).



(a)



(b)



(c)

Figura 13. Resultados del perfil de PF para los extractos finales de los experimentos de la Fig. 12 con cada tipo de ST (a) para hoja, (b) para cuarta y (c) para tercerilla.



Tabla 8. Resultados de la cuantificación de cada polifenol identificado en el extracto de estudio.

X ($\mu\text{g/g ST}$)	ST de Tercerilla	ST de Cuarta	Permeado Cuarta	Retenido Cuarta	ST de Hoja
Ácido gálico	41,83	44,98	27,23	116,17	47,91
Ácido protocatéquico	8,90	-	-	-	9,66
Ácido p-vidroxibenzoico	35,53	38,38	27,28	87,59	37,28
Ácido vanilínico	20,11	48,75	47,67	44,84	41,51
Aldehído siringico	0,62	7,19	0,73	0,12	-
Ácido ferúlico	90,28	306,93	264,37	466,14	271,97

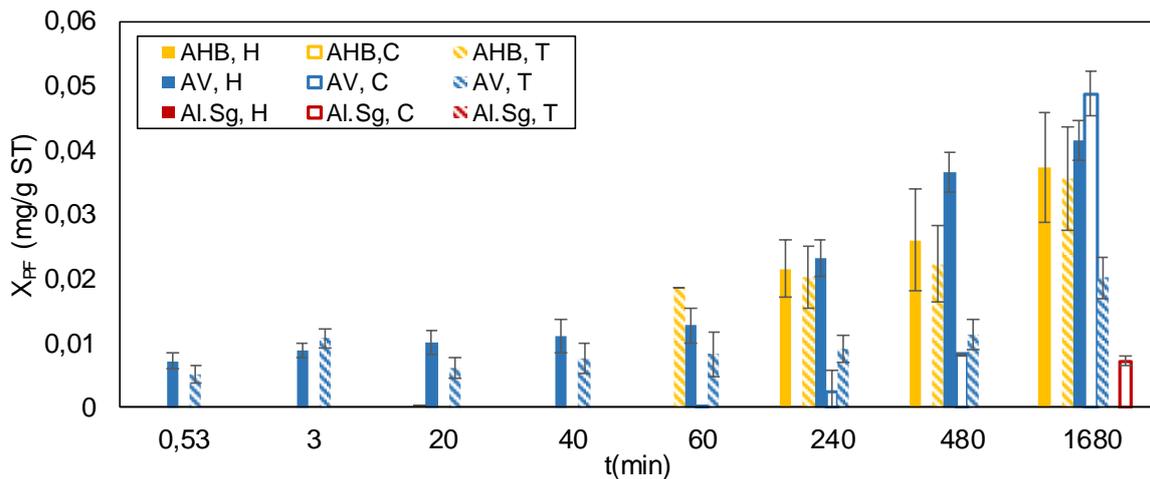


Figura 14. Perfil de compuestos fenólicos para el extracto del EEB a lo largo del tiempo de los experimentos de la Fig. 12. Polifenoles identificados: (a) ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanilínico y aldehído siringico.

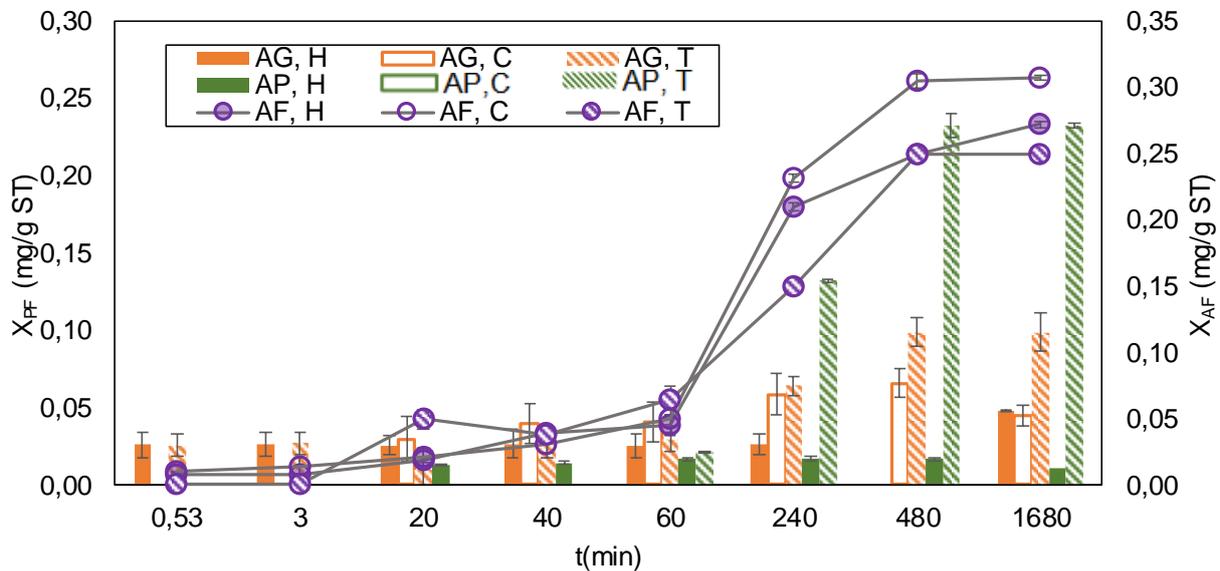


Figura 15. Perfil de compuestos fenólicos para el extracto del EEB a lo largo del tiempo de los experimentos de la Fig. 12. Polifenoles identificados: ácido gálico (AG), ácido protocatéquico (AP) y ácido ferúlico (AF).

En las Figs. 14 y 15 se observa la liberación al medio a lo largo del tiempo de operación del proceso EEB, de los diferentes polifenoles identificados con anterioridad por HPLC para las experimentaciones de la Fig. 12. Algunos de los PF se encuentran presentes en el extracto a tiempos de operación muy bajos (0,53 min) presentando una cinética de extracción más rápida, en concreto, el ácido vanilínico (Fig. 14), el ácido gálico y el ácido ferúlico (Fig.15). Sin embargo, otros aparecen a medida que transcurre el proceso de extracción de PF como el ácido p-hidroxibenzoico, el aldehído siringico (Fig. 14) y el ácido protocatéquico (Fig.15).



Además, destaca el ácido ferúlico (Fig. 15) por la rápida cinética de extracción que presenta y por el aumento que sufre la velocidad de extracción a un tiempo de operación aproximadamente de 60 min. En cambio, la cinética de extracción del ácido gálico y en general del resto de PF, resulta ser menos rápida y con variaciones menos significativas en la velocidad de extracción a lo largo del tiempo de operación.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se extraen del presente trabajo de investigación se detallan a continuación:

- La velocidad de extracción de PF del ST es más rápida, obteniéndose una mayor cantidad de PF al aumentar la temperatura, en la extracción ácida (pH 5), bajo el efecto de la ultrasonificación y utilizando enzimas como biocatalizadores.
- La fracción óptima de celulasa, proteasa y xilanasas, determinada mediante un diseño de experimentos BB basado en la superficie de respuesta, es 0% de celulasa, 1,5% de proteasa y 1,1% de xilanasas. Proporciones de estas enzimas del 1,5% hasta 3% no suponen mejoras en el proceso de extracción de polifenoles.
- El perfil de los compuestos fenólicos de los extractos se ve modificado por la diferente geometría que presentan los distintos tipos de salvado de trigo (hoja, cuarta, tercerilla).
- La tecnología de ultrasonificación supone una mejora del perfil de los compuestos fenólicos dando lugar a extractos con un mayor contenido y variedad de compuestos fenólicos. Esta metodología supone una reducción del tiempo de operación para alcanzar el estado estacionario frente a la extracción en baños agitados.
- Los principales compuestos fenólicos extraídos a partir del salvado de trigo de hoja y cuarta son el ácido ferúlico y el ácido gálico siendo mayoritarios en el de salvado de trigo de tercerilla el ácido portocatóquico y el ferúlico.
- Una ultrafiltración de los extractos con membranas de 3-100 kDa permite concentrar los extractos siendo mucho más ricos en determinados polifenoles.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Anderson, C., Simsek, S., (2019). "A novel combination of methods for the extraction and purification of arabinoxylan from byproducts of the cereal industry", *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1049-1057.
- [2] Cálinoiu, L.F., Vodnar, D.C. (2018). "Whole Grains and Phenolic Acids: A Review on Bioactivity, Functionality, Health Benefits and Bioavailability", *Nutrients*, 10(11), 1-31
- [3] Onipe, O.O., Jideani, A. I., Beswa, D., (2015). "Composition and functionality of wheat bran and its application in some cereal food products", *International Journal of Food Science and Technology*, 50(12), 2509-2518.
- [4] De Paepe, K., Verspreet, J., Rezaei M., et. al., (2018). "Modification of wheat bran particle size and tissue composition affects colonisation and metabolism by human faecal microbiota", *Royal Society of Chemistry*, 10(1), 379-396.
- [5] Balandrán-Quintana, R.R., Mercado-Ruiz, J.N., Mendoza-Wilson, A.M., (2015). "Wheat Bran Proteins: A Review of Their Uses and Potential", *Food Reviews International*, 31(3), 279-293.
- [6] Navrotskyi, S., Guo, G., Baenziger, P., Xu, L., Rose, D., (2019). "Impact of wheat bran physical properties and chemical composition on whole grain flour mixing and baking properties", *Journal of Cereal Science*, 89.
- [7] Roberts, P. J., Simmonds, D. H., Wooton, M., Wrigley, W., (1985). "Extraction of protein and solids from wheat bran", *Journal of the Science of Food Agriculture*, 36(1), 5-10.
- [8] Shewry, P. R. (2009). "The health grain program opens new opportunities for improving wheat for nutrition and health", *Nutrition Bulletin*, 34(2), 225-231.
- [9] Pacheco, M.I., (2015). "Obtención de ácido ferúlico a partir de un concentrado de la hidrólisis alcalina del maíz", Tesis Doctoral (PHD Thesis), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), 1-57.
- [10] Ullauri, P.G., (2010). "Transporte de masa en extracción fase sólido", *Revisión de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*, 10(2), 1-13.



- [11] Nadar, S.S., Rao, P., Rathod, V.K., (2018) "Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review", *Food Research International*, 108, 309–330.
- [12] Quiroz-Castañeda, R.E., Folch-Mallol, J.L., (2011). "Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives", *Biotecnología Aplicada*, 28(4), 195-204.
- [13] Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J., (2012). "Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants", *Trends in Biotechnology*, 30 (1), 37-44.
- [14] Balasubramaniam, V.G., Ayyappan, P., Sathvika, S., Antony, U., (2019). "Effect of enzyme pretreatment in the ultrasound assisted extraction of finger millet polyphenols", *Journal of Food Science and Technology*, 56(3), 1583-1594.
- [15] Coral, G., Arikan, B., Ünalı, M.N., Güvenmez, H., (2002). "Some Properties of Crude Carboxymethyl Cellulase of *Aspergillus niger* Z10 Wild Type Strain" *Turkish Journal of Biology*, 26(4), 209-213.
- [16] Isil, S., Nilufer, A., (2005). "Investigation of Factors Affecting Xylanase Activity from *Trichoderma harzianum* 1073 D3", *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 187-193.
- [17] Singleton, V.L., Rossi, J.A., (1965). "*Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*", *American Journal Enology and Viticulture*, vol 16 (3), 144-158.
- [18] Benzie, I.F.F., Strain, J.J., (1996). "The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay", *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- [19] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., (1995). "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity", *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28(1), 25-30.
- [20] Mugwagwa, L.R., Chimphango, A.F.A., (2019). "Box-Behnken design based multi-objective optimisation of sequential extraction of pectin and anthocyanins from mango peels", *Carbohydrate Polymers*, 219,29-38.
- [21] Montgomery, D.C., (1984). "Design and Analysis of Experiments", Wiley, editor. New York.
- [22] Prabhu, A.A., Jayadeep A., (2017), "Optimization of enzyme-assisted improvement of polyphenols and free radical scavenging activity in red rice bran: A statistical and neural network-based approach", *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(4), 397-405.
- [23] Arranz, S., Calixto, F.S., (2010). "Analysis of polyphenols in cereals may be improved performing acidic hydrolysis: A study in wheat flour and wheat bran and cereals of the diet", *Journal of Cereal Science*, 51(3), 313-318.
- [24] Shahram, H., Dinani, S., Amouheydari, M., (2019). "Effects of pectinase concentration, ultrasonic time, and pH of an ultrasonic-assisted enzymatic process on extraction of phenolic compounds from orange processing waste", *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(1), 487-498.
- [25] Dagostin J.L.A., Carpiné, D., Corazza, M.L., (2015). "Extraction of soybean oil using ethanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: Kinetics and thermodynamics", *Industrial Crops and Products*, 74, 69-75.
- [26] Ho, Y., Harouna-Oumarou A.H., Fauduet, H., Porte, C., (2005). "Kinetics and model building of leaching of water-soluble compounds of *Tilia sapwood*", *Separation and Purification Technology*, 45(3), 169-173.
- [27] Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S., (2002). "Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand", *ScienceAsi*, 28, 241-245.
- [28] Duenas Gómez, Y.M., Narváez Cuenca., C. E., Restrepo Sánchez, L.P., (2008). "Búsqueda de las mejores condiciones para la extracción y medida de actividad de celulasa y xilanasa extraídas de la corteza de pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*)", *Acta Biológica Colombiana*, 13(1), 217-228.
- [29] Roberts, P.J., Simmonds, D.H., Wootton, M., Wrigley C.W., (1985). "Extraction of protein and solids from wheat bran", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 36(1), 5-10.
- [30] Rosicka-Kaczmarek, J., Komisarczyk, A., Nebesny, E., (2018). "Heteropolysaccharide preparations from rye and wheat bran as sources of antioxidants", *Journal of Cereal Science*, 81,37-43.
- [31] Vijayalaxmi, S., Jayalakshmi, S.K., Sreeramulu, K., (2014) "Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties", *Journal of Food Science and Technol*, 52(5),2761-2769.



- [32] Esposito, F., Arlotti, G., Bonifati A.M., Napolitano, A., Vitale, D., et. al., (2005) "Antioxidant activity and dietary Wbre in durum wheat bran by-products", *Food Research International*, 38(10),1167-1173.