



UNIVERSIDAD DE BURGOS
FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS
TRABAJO DE FIN DE GRADO
Curso 2020-2021

Estudio de la recuperación de compuestos bioactivos de salvado de trigo mediante extracción enzimática y con mezclas de etanol-agua

Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos

Área de Ingeniería Química

Tutora: María Olga Ruiz Pérez

Jimena Sainz Cerezo

Julio 2021



Universidad de Burgos
Facultad de Ciencias

**VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL
TRABAJO FIN DE GRADO**

GRADO EN: Ciencia y Tecnología de los Alimentos

CURSO: 2020-2021

Dña. María Olga Ruiz Pérez informa de que la alumna Dña. Jimena Sainz Cerezo, ha realizado el trabajo "Estudio de la recuperación de compuestos bioactivos de salvado de trigo mediante extracción enzimática y con mezclas etanol-agua" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(* En caso negativo, indíquense los motivos:

OBSERVACIONES:

Burgos, a 24 de junio de 2021

Firmado digitalmente por RUIZ
PEREZ MARIA OLGA - 13130364D
Fecha: 2021.06.24 18:56:30
+02'00'

Fdo.: María Olga Ruiz Pérez

ARCHIVO DE LAS MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE GRADO EN RIUBU

D/Dña. Jimena Sainz Cerezo. y D/Dña. María Olga Ruiz Pérez, autor y tutor del Trabajo Fin de Grado 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 24 de junio de 2021

Firmado digitalmente por RUIZ
PEREZ MARIA OLGA - 13130364D
Fecha: 2021.06.24 18:56:46
+02'00'

Fdo.: María Olga Ruiz Pérez

Fdo.: Jimena Sainz Cerezo

ÍNDICE:

ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN	3
2.- OBJETIVOS	4
3.- PARTE EXPERIMENTAL	5
3.1.- MATERIALES	5
3.2.- PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	5
3.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS.....	6
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS DE EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA ...	8
4.1.- EFECTO DE LA ULTRASONICACIÓN.....	8
4.2.- EFECTO DEL TIPO DE ENZIMA	9
4.3.- RESULTADOS DE EXTRACCIÓN PARA DISTINTOS TIPOS DE SALVADOS DE TRIGO	11
4.4.- ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES CINÉTICOS DE EXTRACCIÓN. COMPARACIÓN DE RESULTADOS PARA LOS DISTINTOS SALVADOS DE TRIGO....	15
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS DE EXTRACCIÓN CON MEZCLAS ETANOL-AGUA	16
5.1.- EFECTO DE LA TEMPERATURA.....	16
5.2.- EFECTO DE LA CANTIDAD DE ETANOL EN EL DISOLVENTE.....	16
5.3.- RESULTADOS DE EXTRACCIÓN CON LA MEZCLA 50% AGUA-50% ETANOL....	18
6.- CONCLUSIONS	19
7.- BIBLIOGRAFÍA	20

ABSTRACT

This final degree project shows the experimental results of the recovery of bioactive substances from wheat bran using enzyme biocatalysts and ethanol-water mixtures as extraction agents. Wheat bran (WB) was selected because it is an abundant by-product of wheat flour processing, containing 13-19% high quality proteins with a wide variety of biological functions and 4-8% polyphenolic compounds with antioxidant and anti-tumour activity. Ultrasound-assisted extraction and bath extraction were employed as the extraction techniques. The enzyme biocatalyst was cellulase and a binary mixture of xylanase (40%) and protease (60%). Ethanol-water solutions were mixtures from 0 wt.% to 100 wt.% ethanol. Different extraction tests were carried out in order to analyse the effect of extraction agent and extraction technique on the recovery degree of the polyphenolic and protein fractions from leaf WB, granulated WB and powdered WB.

The extraction results were quite similar, with minor differences, for the three types of WB examined. A faster recovery of polyphenols was obtained by ultrasonic-assisted extraction, compared to bath extraction for all WB and extraction agents. The best recovery of the polyphenolic and protein fractions was obtained by using the xylanase-protease mixture. Gallic acid and ferulic acid have been identified as the main phenolic compounds in WB extracts, with the identification of vanillic acid and syringic aldehyde in all extracts from powdered WB. In addition, the protein recovery was similar in the three WB types, with high proportion of essential amino acids. This amino acid results have confirmed the high food quality of recovered proteins. It can be concluded that the effect of cellulase enzyme and ethanol did not improve the recovery of the polyphenolic and protein fractions in either case. However, ethyl ferulate was the main polyphenolic compound in all ethanol-water WB extracts.

Keywords: wheat bran, phenolic compounds, enzymatic extraction, ultrasounds, antioxidant capacity

1.- INTRODUCCIÓN

El **salvado de trigo** (ST) se obtiene como subproducto mayoritario de la molienda del trigo, representando aproximadamente el 25% del peso del grano y generándose más de 100 millones de toneladas de salvado de trigo al año. Es un subproducto valorizable debido a su composición, ya que presenta un alto contenido en sustancias bioactivas tales como proteínas (13-19% en peso) ricas en aminoácidos esenciales y compuestos fenólicos (4-8% en peso) con elevada función antioxidante [1,2]. En la actualidad, se emplea fundamentalmente como pienso, pero en cantidades limitadas ya que provoca efectos laxantes al ganado [1, 3]. Los estudios más recientes de valorización de este subproducto van destinados a su utilización en la formulación de alimentos funcionales, en productos farmacéuticos y en cosméticos, agregando fracciones molidas del salvado o extractos y liofilizados obtenidos a partir de etapas de extracción ácida, alcalina o con disolventes orgánicos [1, 4, 5]. Sin embargo, este tipo de aplicación industrial todavía es un reto debido a que es un subproducto que presenta cambios en su composición dependiendo de la variedad de trigo, de los métodos de cultivo, así como del tipo de proceso de molienda del grano [1, 2, 6].

En cuanto a la fracción proteica (P) presente en el salvado de trigo, N. De Brier et al. [7] y W. H. Idris et al. [8] han justificado que las proteínas identificadas en este subproducto son fundamentalmente albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas, siendo las albúminas y las glutelinas las más abundantes, representando un 23,5% y un 25,5% de las proteínas totales respectivamente. Estas proteínas están constituidas por un alto número de aminoácidos esenciales y condicionalmente esenciales como la lisina, la arginina y la glicina que les otorgan propiedades funcionales [9]. Sin embargo, al igual que sucede en el caso de los polifenoles, la unión de las proteínas con fibras como la lignina, los arabinosilanos y los beta-glucanos dificulta su digestibilidad y biodisponibilidad en el salvado de trigo [7, 9].

Por otra parte, los compuestos polifenólicos presentes en el salvado de trigo se dividen en dos categorías según su estructura, ya que esta varía según el número y la posición de los

grupos hidroxilo en su anillo aromático [10]. Existen dos grupos de ácidos fenólicos, diferenciados por su estructura: los ácidos derivados del ácido benzoico (hidroxibenzoicos), como el ácido vanilínico, salicílico, siríngico y gálico, y los ácidos derivados del ácido cinámico (hidroxicinámicos), como el ácido ferúlico, el cafeico y el p-cumárico [4, 10, 11]. Este último grupo, presenta una mayor capacidad antioxidante debido a la presencia del grupo $-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ en su estructura, a diferencia de los ácidos hidroxibenzoicos que presentan un grupo $-\text{COOH}$ [10]. K. H. Kim [10] ha publicado que el mayoritario en este tipo de salvados es el ácido ferúlico.

Para los procesos de recuperación de compuestos bioactivos en productos vegetales se suelen utilizar disolventes hidroalcohólicos y biocatalizadores enzimáticos [12,13, 14]. En los procesos de extracción enzimática (EE), pectinasas, celulasas y proteasas permiten la liberación de los compuestos bioactivos al medio con más facilidad y de forma más económica, al romper sus enlaces con los carbohidratos y proteínas de las paredes celulares a los que se encuentran unidos [13, 14]. En el caso del salvado de trigo hay que destacar que la fibra del salvado de trigo (10,5% en peso) está formada por celulosa, arabinosa, xilosa, otras hemicelulosas con distintas solubilidades y estructuras que permiten su unión a los distintos compuestos bioactivos que presenta el salvado, especialmente a los polifenoles (PF) [15]. Es decir, los polifenoles se encuentran unidos a los arabinoxilanos y a la lignina de la pared celular mediante enlaces ésteres y éter [4], siendo necesario para su liberación utilizar biocatalizadores enzimáticos sean capaces de atacar a estos enlaces tales como las xilanasas. En este tipo de extracción, los parámetros más significativos a optimizar son: el tipo de enzima, el tiempo de operación, la temperatura, el tamaño de partícula, las condiciones del sustrato y el tipo de disolvente [14]. Además, un proceso de EE requiere una etapa destinada a inactivar las enzimas después de la extracción, en la que se suele realizar un tratamiento térmico de calentamiento del extracto a temperaturas de 80-90 °C, lo cual puede producir una degradación de la fracción proteica recuperada.

Para mejorar los procesos de extracción, esta técnica se puede combinar con la ultrasonificación [16], ya que debido al fenómeno de cavitación se mejora, en muchos casos, el contacto entre las fases sólido-líquido. Este fenómeno de cavitación aumenta la difusión interna de las sustancias que se desea extraer del sólido y genera roturas en la superficie del material que aumentan su porosidad. Con la apertura de los poros y la rotura de las paredes celulares, se incrementa la superficie de contacto de la fase sólida y el disolvente, se facilita la difusión y se permite una extracción de las sustancias con mayor rapidez [17]. En el caso del salvado de trigo, la extracción asistida por ultrasonidos promueve la rotura celular, produciendo una mejor lixiviación de las proteínas de la fibra al actuar sobre los enlaces éter entre la lignina y las cadenas de hemicelulosa, mejorando la pureza y rendimiento de la extracción [16, 17].

Con lo expuesto anteriormente, en este trabajo se va a estudiar la recuperación de la fracción polifenólica y proteica de distintos tipos de salvados de trigo comerciales, utilizando biocatalizadores enzimáticos y mezclas etanol-agua como agentes de extracción.

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal del trabajo ha sido estudiar la recuperación de sustancias bioactivas de distintos tipos de salvados de trigo comerciales, así como la identificación de los parámetros de extracción que facilitan su liberación a la fase extracto. Este objetivo general se ha desarrollado siguiendo los siguientes objetivos secundarios:

1. Puesta a punto de las técnicas analíticas espectrofotométricas y cromatográficas para la identificación y cuantificación de la fracción fenólica y proteica presentes en los extractos de salvado de trigo. Determinación de las curvas de calibrado.
2. Análisis del efecto de la ultrasonificación, del tipo de salvado y del tipo de enzima en el proceso de extracción enzimática y comparación de los resultados experimentales en

función de la eficacia de extracción de polifenoles totales, la capacidad antioxidante del extracto final y el tipo de polifenoles extraídos.

3. Evaluación del contenido en proteína que presentan los distintos extractos. Cuantificación de las proteínas totales y su calidad desde el punto de vista alimentario.
4. Análisis comparativo de los resultados de la extracción de estas sustancias bioactivas utilizando como agente de extracción mezclas etanol-agua. Este estudio experimental se realizó utilizando un único tipo de salvado de trigo (seleccionado en las etapas anteriores) y con la técnica de extracción en baño y asistida por ultrasonidos.

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- MATERIALES

Para la elaboración de este estudio se empleó ST de tres tipos distintos: Hoja, Cuarta y Tercerilla que, como se observa en la imagen inferior, presentan distintos tipos de granulometría. Todos fueron proporcionados por la empresa Emilio Esteban S.A (Fig. 1).



Figura 1. Fotografía del salvado de trigo (a) Hoja, (b) Cuarta y (c) Tercerilla empleados.

A lo largo del proceso experimental se empleó: agua destilada, agua Mili-Q, acetato de sodio anhidro (CH_3COONa , EMSURE®, pureza $\geq 99,0\%$), ácido acético glacial (CH_3COOH , Panreac, pureza $99,7\%$), etanol absoluto ($\text{H}_3\text{CCH}_2\text{OH}$, VWR Chemicals, pureza 100%) y una serie de enzimas: celulasa (Cellulase from *Aspergillus niger*, SIGMA), xilanasa (Xylanase from *Aspergillus niger*, BIOCON ESPAÑOLA, S.A.) y proteasa (Protease from *Bacillus subtilis* P, BIOCON ESPAÑOLA, S.A.).

En las determinaciones analíticas se emplearon los siguientes reactivos químicos: Folin Ciocalteu's reagent (VWR Chemicals), carbonato sódico (Na_2CO_3 , Honeywell Fluka, pureza $99,0\%$), ácido gálico (GAE, patrones Sigma-Aldrich), acetato de sodio anhidro (CH_3COONa , Scharlau, pureza $99,0\%$), ácido acético glacial (VWR Chemicals, pureza 100%), ácido clorhídrico (HCl, VWR Chemicals, pureza 37%), 2,4,6-tris.2-piridil-s-triazine (TPTZ, TCI: Tokyo Chemical Industry Co.), cloruro de hierro (III) (FeCl_3 , Merck Millipore, pureza $\geq 98,0\%$), sulfato de hierro (II) 7-hidrato ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Panreac, pureza 98%), protein assay reagent A (Bio-Rad DC Protein Assay), protein assay reagent B (Bio-Rad DC Protein Assay), seroalbúmina bovina (albumin bovine serum low in endotoxins, PROLABO), reactivo 1: solución "internal standard" (Norvaline $0,2 \text{ mM}$ en N-propanol 10% , EZ: fast Phenomenex®), reactivo 2: solución de carbonato sódico (Na_2CO_3 , EZ: fast Phenomenex®), reactivo 3A: medio de elución 1 (Hidróxido sódico, EZ: fast Phenomenex®), reactivo 3B: medio de elución 2 (N-propanol, EZ: fast Phenomenex®), reactivo 4: solución orgánica 1 (cloroformo, EZ: fast Phenomenex®), reactivo 5: solución orgánica 2 (iso-octano, EZ: fast Phenomenex®), reactivo 6: solución ácida (ácido clorhídrico 1 N , EZ: fast Phenomenex®), SD: mezclas de aminoácidos estandarizadas (EZ: fast Phenomenex®).

3.2.- PROCESO DE EXTRACCIÓN

En todos los experimentos, se puso en contacto $10,0 \pm 0,1 \text{ g}$ (balanza Practum Sartorius, precisión $\pm 0,0001 \text{ g}$) de los distintos tipos de salvado mostrados en la Figura 1 con 100 mL de agente extractante de distinto tipo, pudiendo ser: tampón acetato a $\text{pH } 5,00 \pm 0,01$ (preparado con el ácido acético glacial y el acetato sódico anhidro), una disolución de etanol-agua (50:50) (elaborada con agua destilada y etanol absoluto), una disolución de proteasa ($1,5\%$) y xilanasa ($1,1\%$) con tampón acetato a $\text{pH } 5,00 \pm 0,01$ y una disolución de celulasa (10%) con tampón acetato a $\text{pH } 5,00 \pm 0,01$.

En los experimentos de **extracción por ultrasonidos** (Fig. 2) se empleó un homogeneizador de ultrasonidos (Vibra-Cell VCX 500, Sonics & Materials Inc, USA,) equipado con una sonda de 13 mm de diámetro, operando a 100% de amplitud y con un baño termostático que operó a 40 °C de temperatura en el caso de la extracción con el tampón acetato y a 60 °C de temperatura en el caso de la extracción con la disolución etanol-agua (50:50).

Las muestras del salvado de trigo con el disolvente se ultrasonificaron durante un tiempo efectivo máximo de 60-90 min (120-180 min de tiempo real), con ciclos de funcionamiento alterno de 5 s (5 s ON y 5 s OFF) para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. Durante este periodo se fueron tomando muestras de 4 mL a intervalos fijados de tiempo. En el caso de que las muestras contuvieran enzima, se inactivaban inmediatamente durante 2 min en un baño con agua a una temperatura de 95-100 °C (baño termostático Selecta Termotronic). Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron (centrifuga Sorval ST 16R, Thermo-Fisher Scientific) durante 10 min a temperatura ambiente y a una velocidad de 4500 rpm. Tras esto, se separó el sobrenadante, con el que se realizaron los análisis indicados en el apartado 3.3 del presente trabajo.

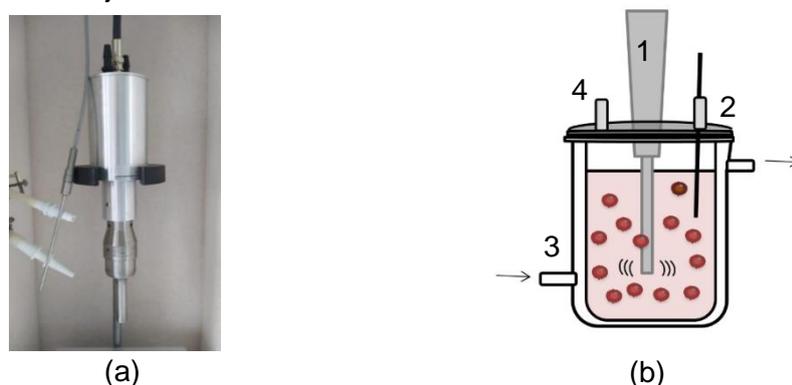


Figura 2. (a) Fotografía de la sonda ultrasónica y (b) esquema del tanque de extracción empleado en la extracción por ultrasonidos. 1. Sonda ultrasónica, 2. Sonda de temperatura, 3. Tanque encamisado conectado a un baño termostático, 4. Toma de muestra.

En el caso de los experimentos de **extracción en baños agitados**, el equipo empleado fue un baño termostático con agitación orbital o de vaivén (Unitronic-OR, P-Selecta) en el que las muestras (ST Cuarta + 100 mL de Etanol absoluto) se mantuvieron a una temperatura de $60,0 \pm 0,1$ °C y con una agitación de $60,0 \pm 0,1$ U/min durante 24-27 h. Se tomaron muestras a diferentes tiempos y se centrifugaron (centrifuga Sorval ST 16R, Thermo-Fisher Scientific) durante 10 min a temperatura ambiente y a una velocidad de 4500 rpm. Al igual que en el caso de la extracción con ultrasonidos, se separó el sobrenadante, con el que se realizó los análisis indicados en el apartado 3.3 del presente trabajo.

3.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS

Para determinar la **humedad** de cada uno de los ST analizados, se tomaron 2 g de cada uno de ellos y se secaron térmicamente durante 48 h en una estufa (J.P. Selecta, S.A.) a 80 °C.

Para determinar el **pH** del tampón acetato elaborado, se empleó un pH-metro GLP21 de la marca Crison con un error de medida de $\pm 0,01$ unidades de pH.

El cálculo de la **fracción en peso de polifenoles (PF)** extraídos se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu, basado en una reacción oxido reducción en la que el reactivo Folin-Ciocalteu se reduce al oxidar a los PF de la muestra dando una coloración azul en la muestra, cuya absorbancia a 750 nm es proporcional a la cantidad de PF de la muestra. Para esta determinación se toman 100 μ L de extracto de ST, al que se realiza una dilución en caso de ser necesaria, y se mezclan con 2,8 mL de agua destilada, 100 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y 2 mL de Na_2CO_3 (7,5% p/v). Esta mezcla se deja en reposo en oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se mide en el espectrofotómetro (Jasco V-750 Spectrophotometer) siendo el autozero el aire. Para el blanco los 100 μ L de extracto se

sustituyen por 100 μL de agua destilada. En el caso de las muestras cuyo agente extractante era el tampón acetato con la enzima y la disolución de alcohol, también se elaboró un blanco en el que los 100 μL se correspondían con el tipo de agente extractante empleado.

La identificación y cuantificación de los principales **tipos de PF** presentes en los distintos extractos de ST se hizo mediante el equipo de cromatografía de líquidos HPLC-DAD Agilent 1100 con una columna Kinetex® de 5 μm Biphenyl 100 Å, 250 x 4,6 mm, siendo la fase móvil A acetato amónico 5 mM (acetato amónico para HPLC, VWR Chemicals, pureza 99,2%) en agua con 1% de ácido acético (ácido acético para HPLC, VWR Chemicals, pureza \geq 99,8%), la fase móvil B acetato amónico 5 mM (acetato amónico para HPLC, VWR Chemicals, pureza 99,2%) en acetonitrilo (acetonitrilo para HPLC, Sigma-Aldrich, pureza \geq 99,8%) con 1% de ácido acético (ácido acético para HPLC, VWR Chemicals, pureza \geq 99,8%), la fase móvil C de acetonitrilo (acetonitrilo para HPLC, Sigma-Aldrich, pureza \geq 99,8%) y la fase móvil D de agua Mili-Q. El gradiente inicial empleado fue un 98% de fase A y un 2% de fase B y el flujo de la fase móvil fue 0,8 mL/min. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente (25 °C) y a una longitud de onda de 280 nm y 330 nm. Para que fueran pinchadas en el cromatógrafo las muestras fueron filtradas con filtros jeringa de celulosa regenerada (Filter-LAB®) de 0,45 μm para evitar la turbidez. Como blanco se empleó metanol para HPLC (VWR Chemicals, pureza 100%) Las curvas de calibrado de los distintos polifenoles estudiados se realizaron con patrones comerciales de Sigma-Aldrich.

La **determinación de la capacidad antioxidante** de los extractos se realizó mediante el método FRAP, basado en la capacidad del TPTZ de reducir el Fe (III) a Fe (II) generando una coloración violeta en la muestra proporcional a su capacidad reductora y que puede ser medida a una absorbancia de 593 nm. Para esta determinación se toman 90 μL de muestra, diluida en caso de que sea necesario, y 2,910 mL de reactivo TPTZ preparado con 25 mL de tampón acetato sódico a pH 3,6 (elaborado con acetato de sodio 0,3 M y ácido acético 0,3 M), 2,5 mL de FeCl_3 20 mM (elaborado con agua Mili-Q y FeCl_3 anhidro), 2,5 mL de TPTZ 10 mM (elaborado con HCl 40 mM y TPTZ) y 3 mL de agua Mili-Q. La mezcla resultante se incubaba en un baño termostático (Mettler) a 37 °C durante media hora y se mide en el espectrofotómetro (Jasco V-750 Spectrophotometer) siendo el autozero el tampón acetato sódico a pH 3,6. Para el blanco se sustituyeron los 90 μL de muestra por 90 μL de agua destilada. Al igual que en el procedimiento anterior, en el caso de las muestras cuyo agente extractante fue el tampón acetato con enzima y la disolución de alcohol, se elaboró un blanco en el que los 90 μL se correspondían al medio extractante empleado.

La **determinación de la fracción en peso proteína total (P)** en los extractos se realizó a partir de un kit de la casa comercial Bio-Rad, constituido por dos reactivos diferentes: A (solución alcalina de tartrato de cobre) y B (reactivo de Folin diluido). El cambio al color azul de las muestras se debe a la reacción que se da entre la proteína con el cobre en un medio alcalino y la posterior reducción del cobre con el reactivo de Folin. Para la preparación de las muestras se toman 100 μL de muestra, diluida en caso de que fuera necesario, 500 μL de reactivo A y se agita mediante un Vortex (V05 series, IBX instruments). Posteriormente se añaden 4 mL de reactivo B y se agita de nuevo con el Vortex. Las muestras se dejan 15 min en reposo y se mide la absorbancia a 750 nm con el espectrofotómetro (Jasco V-750 Spectrophotometer), siendo el autozero el aire. Para el blanco, los 100 μL de muestra se sustituyen por 100 μL de agua destilada y, al igual que en los casos anteriores, cuando el medio extractante fue el tampón acetato con enzima y la disolución de alcohol, se elaboró un blanco en el que los 100 μL se correspondían al medio extractante utilizado.

Tanto en la determinación de PF, como en la medida de la capacidad antioxidante por el método FRAP y en la determinación de P se tomaron muestras de cada uno de los extractos analizados por triplicado.

La identificación y cuantificación de los principales **tipos de aminoácidos** presentes en los distintos extractos de salvado de trigo se realizó mediante una cromatografía de gases HP

6890 Series GC System con un inyector automático Agilent 7683B Series de 8 posiciones tras una derivatización de las muestras mediante el kit de aminoácidos EZ: fast de Phenomenex®. Se pipetea 100 µL de muestra, diluida en caso de que fuera necesario, y se añaden 100 µL del reactivo 1. Tras colocar una punta adsorbente, con una jeringa de 1,5 mL se absorbe el líquido muy lentamente por ella. Sin quitar la punta y la jeringa se añaden 200 µL de agua Mili-Q y se aspira con la jeringa. Se descarta la jeringa y el líquido sobrante. Sin retirar la punta adsorbente, se añaden 200 µL de medio de elución (preparado con 900 µL del reactivo 3A y 600 µL del reactivo 3B) y con una jeringa de 0,6 mL se aspira lentamente hasta que el líquido alcance el filtro blanco de la punta adsorbente. Se expulsa el líquido de la jeringa al interior del vial, de forma que en la punta adsorbente solamente quede el filtro blanco y se añaden 50 µL de reactivo 4 mediante un microdispensador (Drummond® microdispenser, The drummond scientific CO.). Se mezcla el vial en un vórtex (V05 series, IBX instruments) durante 5-8 s y se deja reposar 1 min, se vuelve a agitar y se deja reposar 1 min. Posteriormente, se añaden 100 µL de reactivo 5 con el microdispensador y se mezcla 5 s con el vórtex. Después de reposar 1 min, se pipetea 100 µL del reactivo 6 y se agita 5 s con el vórtex. La mezcla se separa en dos fases y, con ayuda de una pipeta, se separa la fase superior que contiene los aminoácidos y será la que se pinche en el cromatógrafo.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS DE EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA

En este apartado se recogen los resultados experimentales de las cinéticas de extracción en baño y asistida por ultrasonidos para los diferentes ST, utilizando distintos tipos de enzimas como agentes de extracción.

En la primera fase experimental (apartados 4.1 y 4.2) se trabajó con el ST Cuarta y se utilizaron la enzima celulasa (C) y la mezcla xilanas-proteasa (xil.-prot.). Las cantidades de xilanas y proteasa empleadas fueron optimizadas por el método Box-Behnken en un estudio anterior, así como la temperatura empleada de 40 °C y la utilización de tampón acetato a pH 5 como medio disolvente [11]. Finalmente, se trabajó con los otros dos ST bajo las condiciones de operación seleccionadas como óptimas con el ST Cuarta (apartado 4.3).

4.1.- EFECTO DE LA ULTRASONICACIÓN

En la Fig.3 se muestran los resultados de recuperación de PF de ST Cuarta por tratamiento con la mezcla xil.-prot. utilizando un proceso de extracción en baño (EB) y de extracción asistida por ultrasonidos (EUS) a 40 °C.

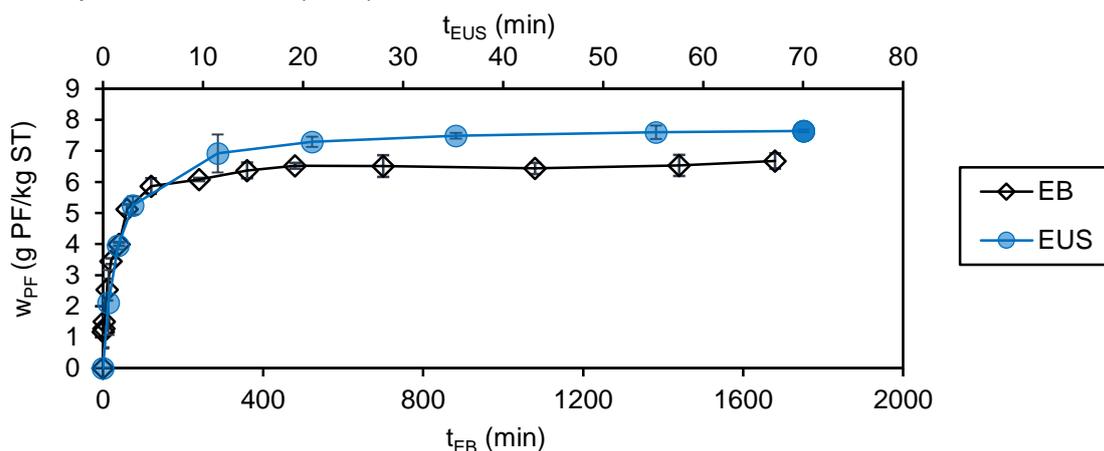


Figura 3. Resultado de las cinéticas de extracción de compuestos polifenólicos (PF) de ST Cuarta por tratamiento con la mezcla xil.-prot. y tampón acetato a pH 5 en un proceso de extracción a 40 °C en baño (EB) y asistido por ultrasonidos (EUS).

Como se puede observar (Fig. 3), la extracción de PF fue considerablemente más rápida en el proceso EUS, ya que tras 11 min de este tratamiento el extracto obtenido contenía unos 7 g PF/kg ST, mientras que el extracto obtenido por EB contenía unos 6 g PF/kg ST después de 300 min.

Por otro lado, también se puede apreciar (Fig. 3) que el efecto de la ultrasonicación aumentó el grado de recuperación de la fracción polifenólica del ST, obteniéndose un extracto con $7,6 \pm 0,3$ g PF/kg ST a los 70 min de la EUS y un extracto con tan solo $6,6 \pm 0,1$ g PF/kg ST después de 28 h en la EB. Este resultado prueba que el fenómeno de cavitación generado por la onda ultrasónica acelera el proceso de actuación de las enzimas presentes en el medio [17].

Con estos resultados se puede concluir que la ultrasonicación ha resultado ser una técnica de agitación eficiente que repercute favorablemente el tratamiento enzimático de este material vegetal, promoviendo mayores grados de recuperación de la fracción polifenólica del ST en menos tiempo de operación. Por ello, se seleccionó la tecnología de EUS para posteriores experimentos de extracción enzimática.

4.2.- EFECTO DEL TIPO DE ENZIMA

Como se ha comentado anteriormente, la celulosa es una de las principales fibras que componen el ST y que dificultan tanto la extracción de los compuestos bioactivos unidos a los arabinosilanos, como la extracción de las proteínas de su estructura [15, 16, 17, 18, 19, 20]. Por ello, se realizó el estudio comparativo de extracción EUS a 40 °C con ST Cuarta utilizando 10% de celulosa y con la mezcla xil. (1,1%) -prot. (1,5%), cuyos resultados se muestran en las Tablas 1 y 2 y en las Figs. 4 y 5.

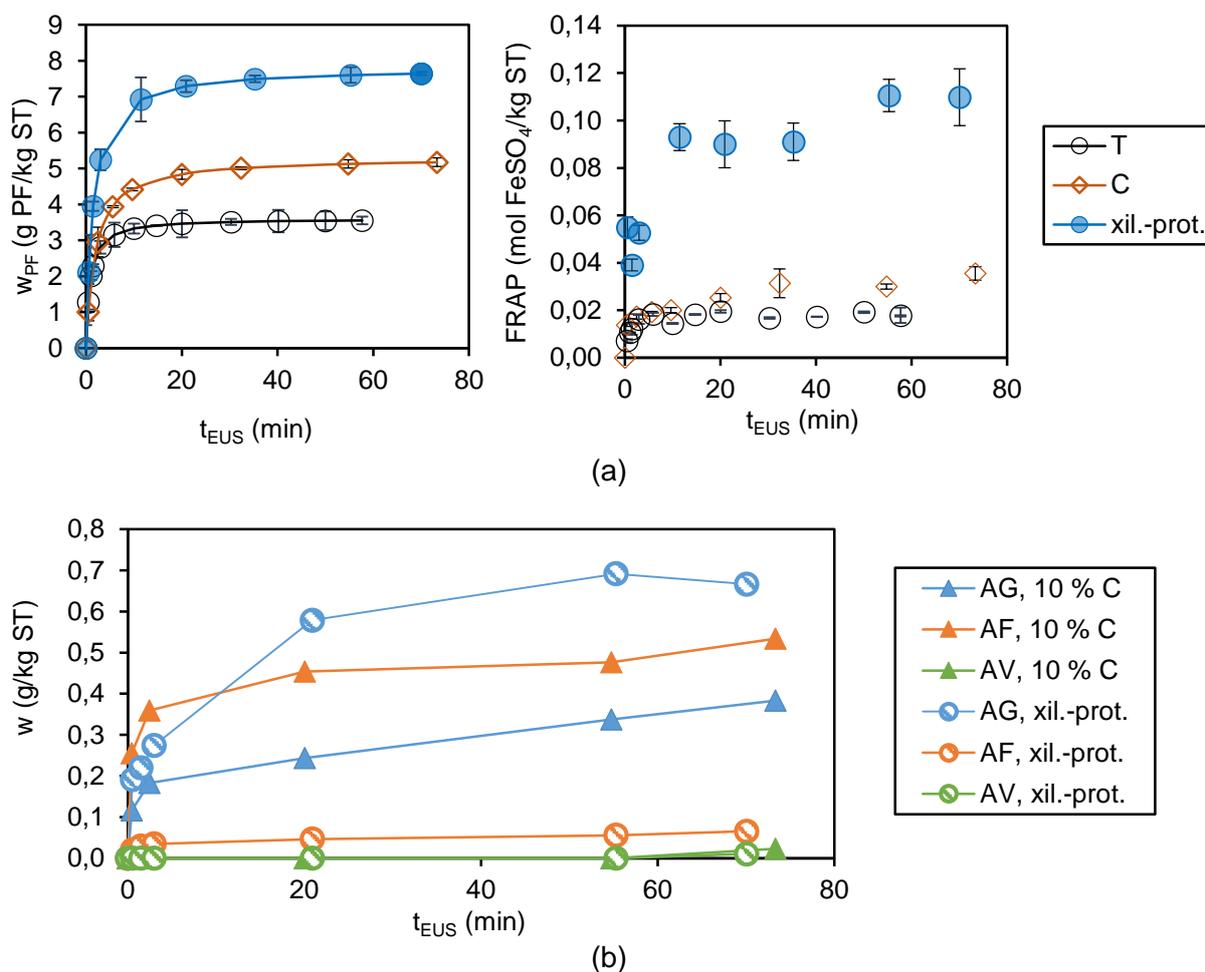


Figura 4. Resultados de las cinéticas de extracción (a) de PF totales junto con el valor del FRAP y (b) de los ácidos ferúlico (AF), gálico (AG) y vanilínico (AV) obtenidos por EUS a 40 °C a partir de ST Cuarta empleando como disolvente tampón acetato a pH 5 sin enzima (T), con celulosa (C) y con mezcla xilanasas-proteasa (xil.-prot.).

La Fig. 4 (a) muestra que la extracción de los compuestos PF del ST resultó mucho menor al utilizar tampón acetato sin enzimas ($3,51-3,55 \pm 0,05$ g PF/kg ST para los extractos $t_{EUS} \geq 20$ min) que al utilizar ambos tratamientos enzimáticos. En cuanto al efecto del tipo de enzimas, en esta Fig. se observa que la extracción de PFs totales resultó considerablemente más baja para el tratamiento con un 10% en peso de C ($4,83-5,17 \pm 0,05$ g PF/kg ST para $t_{EUS} \geq 20$ min) que para el tratamiento con la mezcla xil.-prot. ($2,29-7,64 \pm 0,07$ g PF/kg ST para $t_{EUS} \geq 20$ min), a pesar de que la cantidad total de enzima utilizada en este segundo caso fue solamente de un 2,6% en peso. Los resultados experimentales de la capacidad antioxidante representados comparativamente en la Fig. 4 (a) indican que la capacidad antioxidante de los extractos crece al aumentar el contenido en PFs totales. A modo de ejemplo se observa que después de unos 60 min de ultrasonificación, la capacidad antioxidante del extracto de ST Cuarta tratado con xil.-prot. fue casi tres veces superior ($0,11 \pm 0,01$ mol FeSO_4 /kg ST) que al emplear un 10% en peso de C ($0,04 \pm 0,01$ mol FeSO_4 /kg ST) y ambos mucho más elevados que cuando se utilizó como disolvente tampón acetato libre de enzimas ($0,02 \pm 0,01$ mol FeSO_4 /kg ST).

Por otra parte, la Fig. 4 (b) muestra que los PF identificados como mayoritarios en los extractos de ST Cuarta han resultado ser los mismos para el tratamiento con C que para el tratamiento con la mezcla xil.-prot., sin embargo, el tiempo de ultrasonificación y el tipo de enzima afectaron considerablemente a la cantidad relativa de cada uno de ellos en los extractos. De forma general, se puede establecer que los extractos presentaron un contenido mayor en ácido gálico (AG) en el tratamiento del ST con la mezcla xil.-prot. y un contenido mayor en ácido ferúlico (AF) en el tratamiento del ST con la mezcla celulasa. En cuanto al tiempo de ultrasonificación, se establece que se requieren tiempos de 60 min para obtener una buena recuperación de la fracción polifenólica del ST Cuarta tratado con la mezcla xil.-prot.

En la Tabla 1 del apartado 4.3 se recogen los resultados experimentales de la cantidad de P total recuperada en el último extracto (E_{final}) a un $t_{EUS(\text{final})} = 70$ min de estos experimentos de la Fig. 4.

La comparación de los resultados muestra que la P total presente los tres extractos fue pequeña, con valores de $0,78 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/kg}$ ST para el extracto del experimento con tampón acetato libre de enzimas, de $1,77 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/kg}$ ST para el extracto del tratamiento con la enzima C y de $0,67 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/kg}$ ST para el extracto del tratamiento con la mezcla xil.-prot. Sin embargo, la cantidad de aminoácidos libres totales (aa) fue significativamente diferente en estos tres extractos, obteniendo resultados de $18,6 \pm 0,2$ $\mu\text{mol aa/kg}$ ST, $40,3 \pm 0,2$ $\mu\text{mol aa/kg}$ ST y $67,1 \pm 0,2$ $\mu\text{mol aa/kg}$ ST para los experimentos con el tampón sin enzima, con la enzima C y con la mezcla xil.-prot., respectivamente. Estos resultados de P y aa total justifican el importante efecto de la presencia de enzima y del tipo de enzima en la cantidad y en las características de la fracción proteica extraída del ST. Tal y como demuestra el estudio de N. de Brier et al., para la misma cantidad de enzima, el empleo de una extracción con xilanasa aumenta la extracción de proteína un 24,4 %, mientras que con celulasa aumenta un 11 % respecto al control [7]. En este estudio, la extracción de P también se vio favorecida con el empleo de la mezcla xil.-prot. ya que los arabinosilanos (AX) son una de las fibras mayoritarias del ST. Su cadena principal está constituida por unidades de β -(1-4)-D-xilopiranosilos unidas mediante enlaces glucosídicos sobre los que puede actuar la xilanasa, permitiendo la liberación de compuestos bioactivos como polifenoles y proteínas [18, 19, 20]. Los AX pueden encontrarse unidos a proteínas de las paredes celulares, por lo que la combinación de la xilanasa con la enzima proteasa, que rompe estos enlaces, facilita el acceso de la xilanasa a la estructura de los AX, mejorando la extracción [18, 22, 23].

También es importante indicar que lisina, alanina, leucina y ácido glutámico fueron identificados como los aa mayoritarios en los E_{final} obtenidos con un $t_{EUS} = 70$ min para los experimentos de la Fig. 4. Las cantidades obtenidas mediante las EUS con agentes enzimáticos fueron superiores a las obtenidas mediante la EUS con tampón acetato libre de enzimas, resultado superiores en el caso de la EUS con la mezcla xil.-prot., tal y como se ve reflejado la Fig. 5.

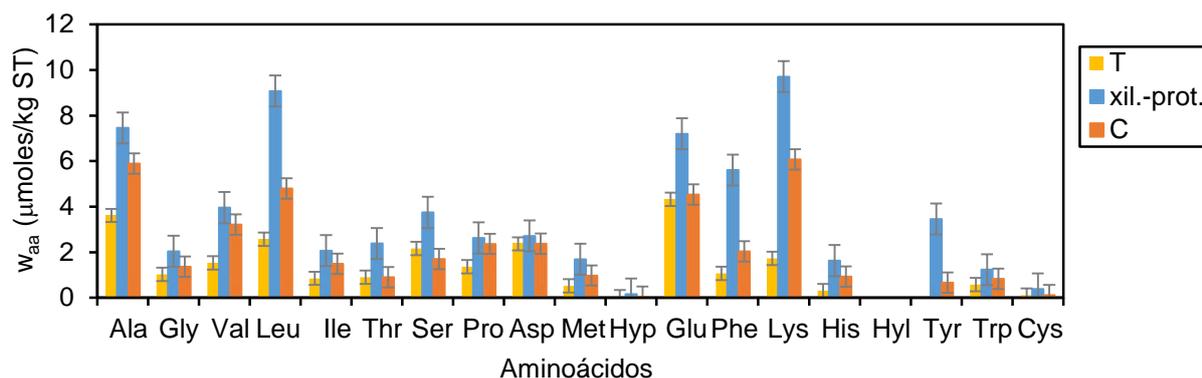


Figura 5. Resultados de la identificación y cuantificación de los aminoácidos de la fracción proteica presente en los extractos de ST Cuarta tras una EUS durante un tiempo de 70 min para los experimentos con tampón acetato sin enzima (T), con la mezcla xilanasa-proteasa (xil.-prot.) y con celulasa (C) al 10 % en peso.

4.3.- RESULTADOS DE EXTRACCIÓN PARA DISTINTOS TIPOS DE SALVADOS DE TRIGO

Como se ha comentado anteriormente, la extracción de compuestos bioactivos del ST Cuarta resultó superior para el tratamiento con la mezcla de enzimas xil.-prot., siendo por ello seleccionada para la realización de los experimentos de EUS para los ST Hoja y Tercerilla.

En la Fig. 6 se representa la extracción de PF en los distintos ST, empleando o no la mezcla de 2,6% en peso de enzimas xil.-prot. en el tampón acetato a pH 5. Como se puede observar en la figura, el contenido en PF de los ST se ve duplicado tras el empleo de la mezcla xil.-prot., pasando de valores de entre 3,08-4,05±0,05 g PF/kg ST, a valores de 7,11-7,82±0,05 g PF/kg ST.

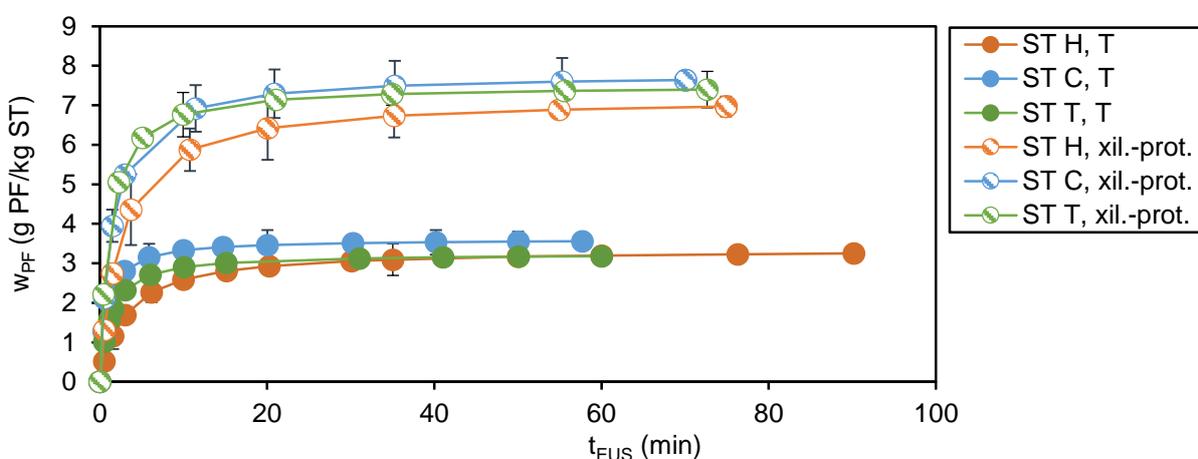


Figura 6. Resultado de las cinéticas de EUS a 40 °C de PF en los ST Hoja (ST H), Cuarta (ST C) y Tercerilla (ST T) empleando tampón acetato sin enzima (T) y la mezcla xilanasa-proteasa (xil.-prot.).

A pesar de obtener una cantidad similar de PF totales en el E_{final} para los tres tipos de ST utilizados, se observa en la Fig. 7 que la relación relativa entre los PF identificados como mayoritarios fue considerablemente diferente. Según Sylvester y Navam, los PF mayoritarios del ST son el ácido ferúlico, el aldehído siríngico, el ácido gentísico y el ácido cafeico, pudiendo aparecer otros como el ácido protocatéquico, el ácido p-hidroxibenzoico, el ácido vanilínico, el ácido clorogénico y el ácido p-cumárico [24]. Los estudios de K. Zhou et al. y de J. Rosicka et al. también se identifica el ácido ferúlico como el mayoritario de los ST [25, 26]. Según V. Urías et al. los ácidos mayoritarios son el ferúlico y el cumárico, pudiendo aparecer otros como el ácido sinápico, cafeico y trazas de PF que no pudieron ser detectados por encontrarse en cantidades muy bajas [27].

En la Fig. 7, se presentan los resultados de las concentraciones de cada uno de los PF que fueron detectados por el HPLC, para los seis tipos de extractos de ST obtenidos por EUS con (b) o sin (a) la mezcla de enzimas xil.-prot. A diferencia de los datos encontrados en bibliografía, el polifenol mayoritario en todas las muestras fue el ácido gálico (AG), siendo el ácido ferúlico (AF) el segundo más abundante, con excepción del extracto de ST Tercerilla extraído por EUS con tampón acetato a pH 5 sin la mezcla de enzimas, cuyo polifenol mayoritario sí fue el AF, seguido del AG.

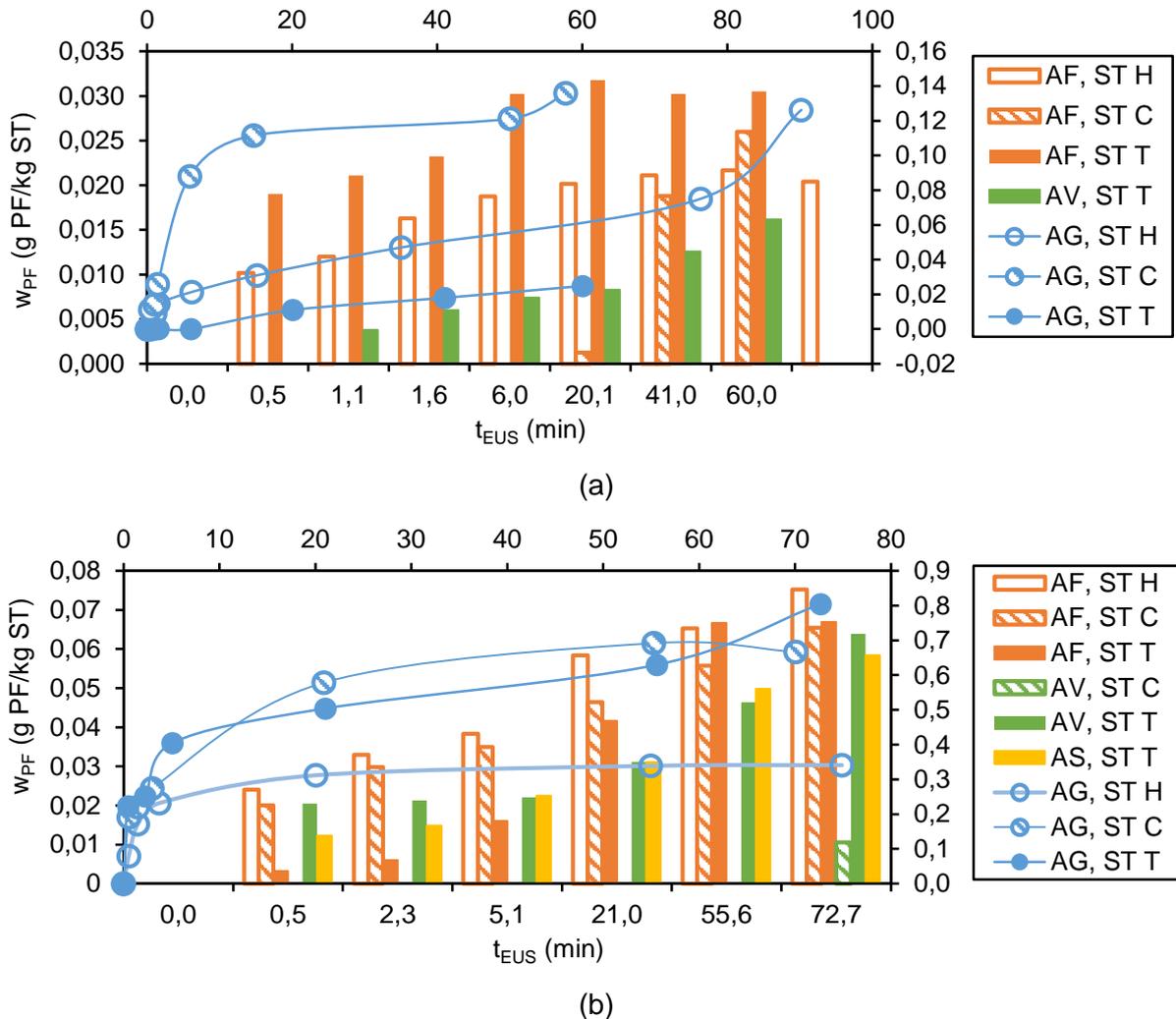


Figura 7. Resultados de los valores obtenidos de ácidos ferúlico (AF), gálico (AG), vanilínico (AV) y aldehído siríngico (AS) en los ST Hoja, Cuarta y Tercerilla (a) con tampón acetato sin enzima (T) y (b) con la mezcla de enzimas xilanas-proteasa a lo largo de la EUS.

Cabe destacar, la presencia de ácido vanilínico (AV) en el ST Tercerilla, tanto en los extractos obtenidos por EUS con la mezcla de enzimas como en los que fueron obtenidos solamente con el tampón acetato a pH 5. Como se aprecia en la Fig. 7 (b), la cantidad de PF en los extractos aumentó la EUS con xil.-prot., facilitando su identificación. Se pudo identificar AV en el ST Cuarta y aldehído siríngico (AS) en el ST Tercerilla. En las muestras también aparecían otros tipos de PF que no pudieron ser identificados por presentarse en concentraciones muy bajas.

Por otro lado, como se puede observar en los resultados recogidos en la Tabla 1, la capacidad antioxidante por el método FRAP de los E_{final} de los ST tratados con EUS sin la mezcla de enzimas es similar, siendo algo superior en el E_{final} del ST Tercerilla puesto que presenta una mayor cantidad de AF y AV. En el caso de la capacidad antioxidante de los E_{final} de los ST tratados con EUS con xil.-prot., el E_{final} con mayor capacidad antioxidante fue el del ST Cuarta,

pese a que el de ST Tercerilla presentaba mayor cantidad de PF identificados. Esto puede ser debido a la presencia de otros PF presentes en el E_{final} del ST Cuarta que no pudieron ser identificados y que, sin embargo, sí que influyeron en su capacidad antioxidante. De los resultados de los E_{final} del ST Cuarta tratado con las distintas diluciones de etanol-agua se hablará con detenimiento en el apartado 5 del presente trabajo.

Tabla 1. Composiciones de los E_{final} obtenidos después de un tiempo (t_F) de extracción para distintos experimentos de extracción en baño (EB) y de extracción asistida por ultrasonidos (EUS). Desviación estándar en un intervalo de $\pm 0,01$ a $\pm 0,6$ con $n=3$.

Extracción	T (°C)	t_F (min)	ST	Disolvente	FRAP (mol FeSO ₄ /g ST)	W _{PF} (g PF/kg ST)	W _P (μmol/kg ST)	W _{aa} (μmol/kg ST)
EUS	40	70	Hoja	T	0,02	3,22	0,77	26,1
EUS	40	70	Cuarta	T	0,02	4,05	0,78	18,6
EUS	40	70	Tercerilla	T	0,03	3,08	0,82	48,9
EUS	40	70	Hoja	T, xil.-prot.	0,09	7,11	0,61	43,0
EUS	40	70	Cuarta	T, xil.-prot.	0,11	7,82	0,67	67,1
EUS	40	70	Tercerilla	T, xil.-prot.	0,08	7,36	0,87	133,9
EUS	40	70	Cuarta	T, 10% C	0,04	5,36	1,77	40,3
EUS	60	60	Cuarta	50% ETOH	0,04	5,70	1,09	7,1
EB	60	840	Cuarta	100% ETOH	0,02	2,51	0,31	3,3

Según su solubilidad, las proteínas del ST se clasifican en fracciones: albumina, globulina, prolamina y glutelina. El ST principalmente contiene albumina, globulina y prolamina, siendo la albumina y la glutelina las más destacadas [7, 8, 9]. En el caso de la cantidad de P en los E_{final} , tanto para los ST sometidos a una EUS con la mezcla de enzimas como los tratados sin ella, presentan cantidades comprendidas entre 0,61-0,87 μmol/kg ST, siendo el E_{final} del ST Tercerilla obtenido por EUS con la mezcla de xil.-prot. el que mayor contenido en P contenía de todos (0,87±0,03 μmol/kg ST). En cuanto a las cantidades de aa, cabe destacar el valor del E_{final} del ST Tercerilla obtenido tanto por EUS con tampón acetato sin agente enzimático (48,9±0,2 μmol/kg ST) como con la mezcla xil.-prot. (133,9±0,2 μmol/kg ST). Los valores tan elevados de la fracción proteica de este E_{final} pueden deberse a que el ST Tercerilla, al proceder de una molienda más fina, presente restos de la molienda del grano.

La proteína del ST presenta un perfil de aminoácidos esenciales más equilibrado que las proteínas de otro tipo de harinas, por ser rico en aminoácidos esenciales como la lisina y el triptófano [7, 21], siendo los aminoácidos mayoritarios el ácido aspártico, el ácido glutámico, la glicina, la prolina, la leucina y la arginina [7]. También se han observado cantidades considerables de valina, lisina, fenilalanina e isoleucina [28]. Según el trabajo de N. De Brier et al. los aminoácidos obtenidos de forma mayoritaria en el ST fueron el ácido glutámico, la glicina, el ácido aspártico y la prolina [7]. En el caso de E. Arte et al. los aminoácidos obtenidos de forma mayoritaria fueron el ácido glutámico, la prolina, la leucina y la arginina [21].

La Fig. 8 muestra la cantidad de los aminoácidos y en la Tabla 2 se han recogido los resultados de los obtenidos de forma mayoritaria en los E_{final} de cada tipo de ST. En el caso de los ST Hoja y Cuarta que no recibieron un tratamiento enzimático, los aa mayoritarios fueron el ácido glutámico (Glu), la alanina (Ala), el ácido aspártico (Asp) y la leucina (Leu). Tras la EUS con la mezcla de enzimas xil.-prot., los aa obtenidos de forma mayoritaria en los E_{final} de estos dos tipos de ST fueron Leu, Lys, Glu y Ala. En el Asp, no se observó aumento en su concentración, pasando de 2,37 a 2,71±0,2 μmol/kg ST en el caso del ST Cuarta tras su tratamiento enzimático. Sin embargo, la Lys y la Leu, aminoácidos de gran relevancia por ser esenciales, presentaron un aumento considerable, pasando de 1,72 a 9,71 ±0,2 μmol/kg ST y de 2,57 a 9,08±0,2 μmol/kg ST respectivamente en el ST Cuarta tras su tratamiento enzimático. Sucedió de igual forma en el ST Hoja.

Tabla 2. Resultados de la fracción de aminoácidos mayoritarios en los E_{final} para los mismos experimentos mostrados en la Tabla 1.

Extracción	T (°C)	t _F (min)	ST	Disolvente	Glu	Ala	Asp	Leu	Lys	Val
EUS	40	70	Hoja	T	6,94	4,49	3,97	3,38	1,83	-
EUS	40	70	Hoja	T, xil.-prot.	5,74	4,98	2,81	6,41	6,31	-
EUS	40	70	Cuarta	T	4,32	3,61	2,37	2,57	1,72	-
EUS	40	70	Cuarta	T, xil.-prot.	7,20	7,46	2,71	9,08	9,71	-
EUS	40	70	Tercerilla	T	-	8,00	4,02	4,53	4,41	3,54
EUS	40	70	Tercerilla	T, xil.-prot.	-	15,76	4,27	19,10	16,97	12,30
EUS	40	70	Cuarta	T, 10% C	4,53	5,89	2,37	4,80	6,07	-
EUS	60	60	Cuarta	50% ETOH	2,14	1,66	1,31	-	-	-
EB	60	840	Cuarta	100% ETOH	0,46	0,66	1,58	-	0,45	-

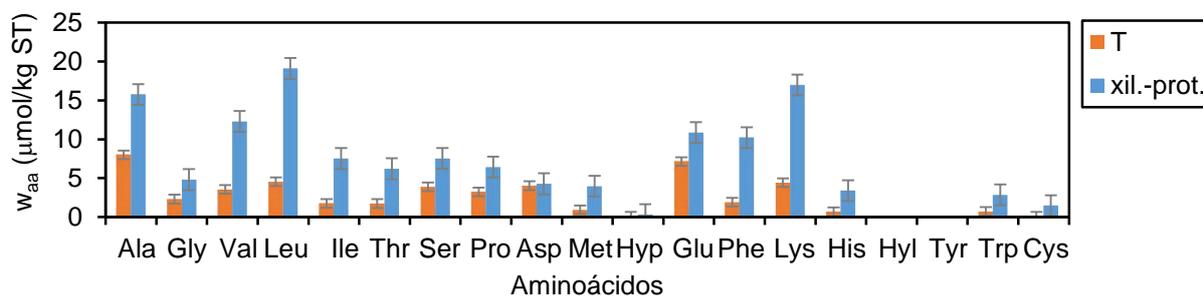
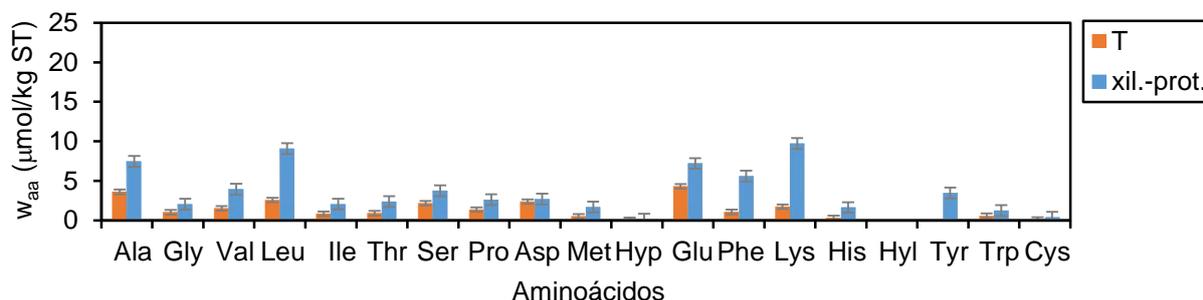
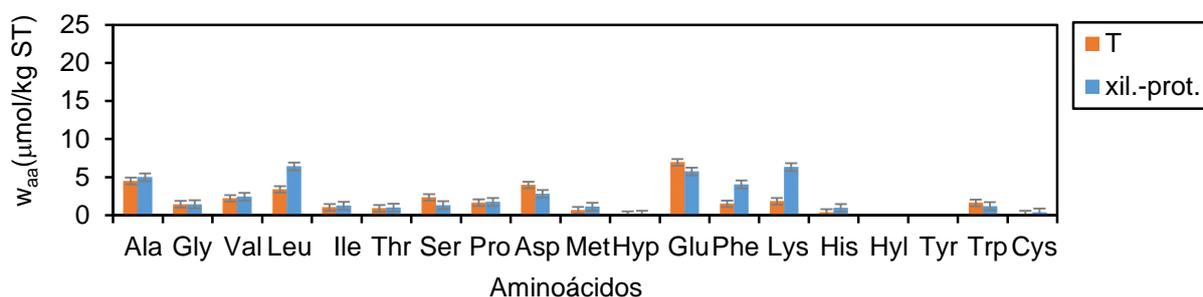


Figura 8. Resultados de la fracción molar de aminoácidos en los E_{final} de los ST tras la EUS a 40 °C para el ST de (a) Hoja, (b) Cuarta (c) Tercerilla utilizando como disolvente tampón acetato a pH 5 libre de enzima (T) y con xilanas-proteasa (xil.-prot.).

En el E_{final} del ST Tercerilla obtenido por EUS con tampón acetato a pH 5 sin agente enzimático, Ala, Leu, Lys y Asp, fueron los aa mayoritarios, presentando valores considerablemente superiores a los presentes en los E_{final} de los otros dos ST sometidos al

mismo tratamiento. Esto se debe fundamentalmente al tipo de ST y a que un menor diámetro de partícula facilita la extracción [7]. Tras la EUS con xil.-prot., los aa mayoritarios fueron Leu, Lys, Ala y Val. La leucina, la lisina y la valina, son aminoácidos esenciales y el aumento en su concentración tras el tratamiento enzimático, pasando de 4,53 a 19,10±0,2 µmol/kg ST, de 4,41 a 16,97±0,2 µmol/kg ST y de 3,54 a 12,30±0,2 µmol/kg ST, respectivamente, convierten a las proteínas del ST Tercerilla una fuente interesante de aminoácidos esenciales.

4.4.- ESTIMACIÓN DE LOS COEFICIENTES CINÉTICOS DE EXTRACCIÓN. COMPARACIÓN DE RESULTADOS PARA LOS DISTINTOS SALVADOS DE TRIGO

Para poder evaluar y comparar las cinéticas de extracción de los PF en el ST, se elaboran modelos a partir de la integración de la siguiente ecuación [29, 30]:

$$\frac{dw_t}{dt} = k * (w_s - w_t)^n \quad (1)$$

En la que k representa la constante cinética de extracción (min⁻¹), w_s la cantidad de polifenoles totales cuando se alcanza el equilibrio, en nuestro caso en el extracto final (g PF/kg ST), w_t la concentración de PF extraídos con el tiempo y n el orden de la ecuación [29, 30]. En el caso de las extracciones sólido-líquido, el modelo que mejor se adecua a los datos es el de orden 2 [30]. Considerando t= 0 y w_t= 0, se integra la ecuación (1) y se obtiene para orden 2 la siguiente ecuación: [29, 30]

$$w = \frac{t}{\left(\frac{1}{h}\right) + \left(\frac{t}{w_s}\right)} \quad (2)$$

Para poder calcular h y w_s, la ecuación 2 se debe linealizar, obteniendo la siguiente ecuación:

$$\frac{t}{w} = \frac{1}{h} + \frac{t}{w_s} \quad (3)$$

Para obtener los resultados de los valores de h y de w_s, se representó t/w_t vs. t en cada uno de los experimentos realizados tal y como se refleja en la Fig. 9, ya que h se corresponde a la velocidad inicial de extracción y es el inverso de la ordenada en el origen de la ecuación de la recta obtenida para t/w_t vs. t y w_s es la capacidad de extracción y se obtiene con el inverso de la pendiente de la ecuación de la recta obtenida para t/w_t vs. t. [30].

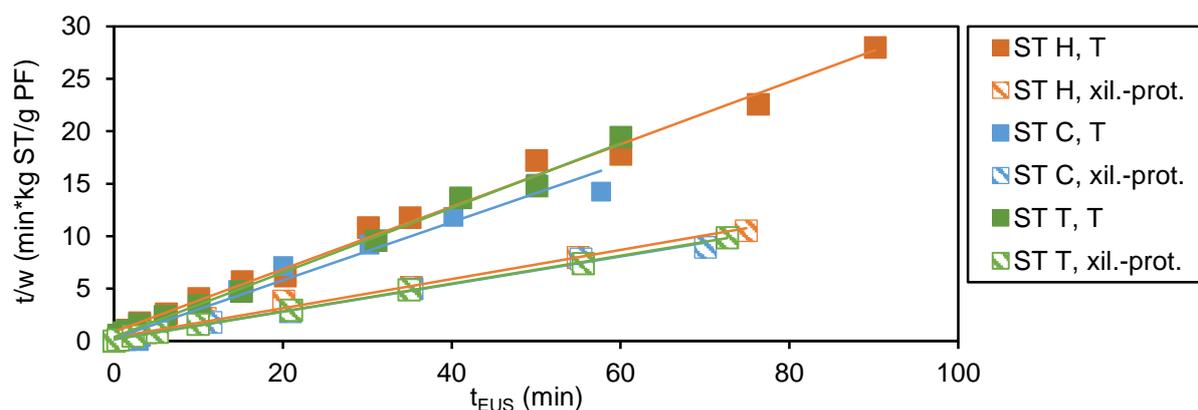


Figura 9. Ajuste lineal de los resultados de los experimentos de la Fig. 6 siguiendo el modelo cinético potencial de orden 2 mostrado en la ecuación 2.

Como se observa en la Tabla 3, la velocidad inicial de extracción (h) de los ST Cuarta y Tercerilla es superior a la velocidad inicial de extracción del ST Hoja, tanto para las muestras tratadas con enzima como para las muestras tratadas sin ella. Esto se debe a que la velocidad de extracción y la capacidad de extracción dependen del tipo de geometría y granulometría del ST. Cuanto menor sea el tamaño de partícula obtenido en la molienda del ST, mayor será la superficie de contacto y la exposición de los compuestos bioactivos con el medio extractante [31].

Cuanto mayor número de PF sean accesibles durante el proceso de extracción, mayor velocidad y capacidad de extracción tendrá el ST. Por eso, al añadir la mezcla de enzimas xil.-prot., también se ven incrementadas. Sin embargo, en el caso de las muestras con 10% en peso de celulasa la velocidad de extracción es menor que en el ST Cuarta sin enzima, a pesar de que la capacidad de extracción se es superior. La capacidad de actuación de la enzima en el sustrato también depende de la accesibilidad, la superficie, la porosidad y el tamaño de partícula de este, por ello el ST Tercerilla es el que mayor aumento presenta en la velocidad de extracción, pasando de 2,72 a 6,85 g PF/kg ST min [32].

En las soluciones de etanol, la velocidad de extracción es menor, especialmente en la muestra con etanol 100% y la capacidad de extracción aumenta para la muestra con etanol al 50% y disminuye para la muestra con 100% de etanol. Esto se debe a que gran parte de los PF del ST solo son solubles en agua.

Tabla 3. Coeficientes cinéticos para las cinéticas de extracción de los experimentos de las Fig. 4, 6 y 11 calculados a partir de la ecuación 3.

Extracción	T (°C)	t _F (min)	ST	Disolvente	R ²	h (g PF/kg ST min)	w _s (g PF/kg ST)
EUS	40	70	Hoja	T	0,9933	1,14	3,35
EUS	40	70	Cuarta	T	0,9765	4,30	3,61
EUS	40	70	Tercerilla	T	0,9954	2,72	3,24
EUS	40	70	Hoja	T, xil.-prot.	0,9921	2,97	7,19
EUS	40	70	Cuarta	T, xil.-prot.	0,9955	5,36	7,80
EUS	40	70	Tercerilla	T, xil.-prot.	0,9991	6,85	7,51
EUS	40	70	Cuarta	T, 10% C	0,9954	2,71	5,31
EUS	60	60	Cuarta	50% ETOH	0,9961	2,88	5,71
EB	60	840	Cuarta	100% ETOH	0,9977	0,14	2,61

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS ESTUDIOS DE EXTRACCIÓN CON MEZCLAS ETANOL-AGUA

Como los PF contenidos en el ST son más fácilmente extraíbles en disolventes acuoso-orgánicos [5], se realizaron distintas extracciones, tanto en baño como asistida por ultrasonidos, con distintas disoluciones de etanol-agua a diferentes concentraciones como agente extractante para comparar su eficacia respecto a la extracción en el tampón acetato a pH 5 en el ST Cuarta.

5.1.- EFECTO DE LA TEMPERATURA

Las condiciones experimentales para este procedimiento no estaban establecidas, por lo que esto fue lo primero que se llevó a cabo mediante modificaciones en la temperatura y de las concentraciones de las mezclas de etanol-agua. Como se puede ver en la Fig. 10 (a), se realizaron distintas EUS para el ST Cuarta con disoluciones de etanol-agua al 50% en peso a diferentes temperaturas comprendidas entre 35 y 60 °C.

Para esta concentración de etanol, se observó una mayor extracción de PF a 60 °C, ya que la cantidad de PF extraídos para tiempos de ultrasonificación de 20 min fueron superiores (5,2±0,1 g PF/kg ST) en comparación con los obtenidos a 35 °C (3,9±0,1 g PF/kg ST) y a 50 °C (4,2±0,1 g PF/kg ST). Con estos resultados, se seleccionó la temperatura de 60 °C para posteriores experimentos de extracción.

5.2.- EFECTO DE LA CANTIDAD DE ETANOL EN EL DISOLVENTE

Una vez establecida la temperatura de trabajo, se pasó a determinar la concentración más adecuada de etanol en el disolvente etanol-agua. Para ello, tal y como se observa en la Fig. 10 (b), se realizaron distintas EB para el ST Cuarta a 60 °C con disoluciones de etanol-agua con porcentajes de etanol del 0 a 100%.

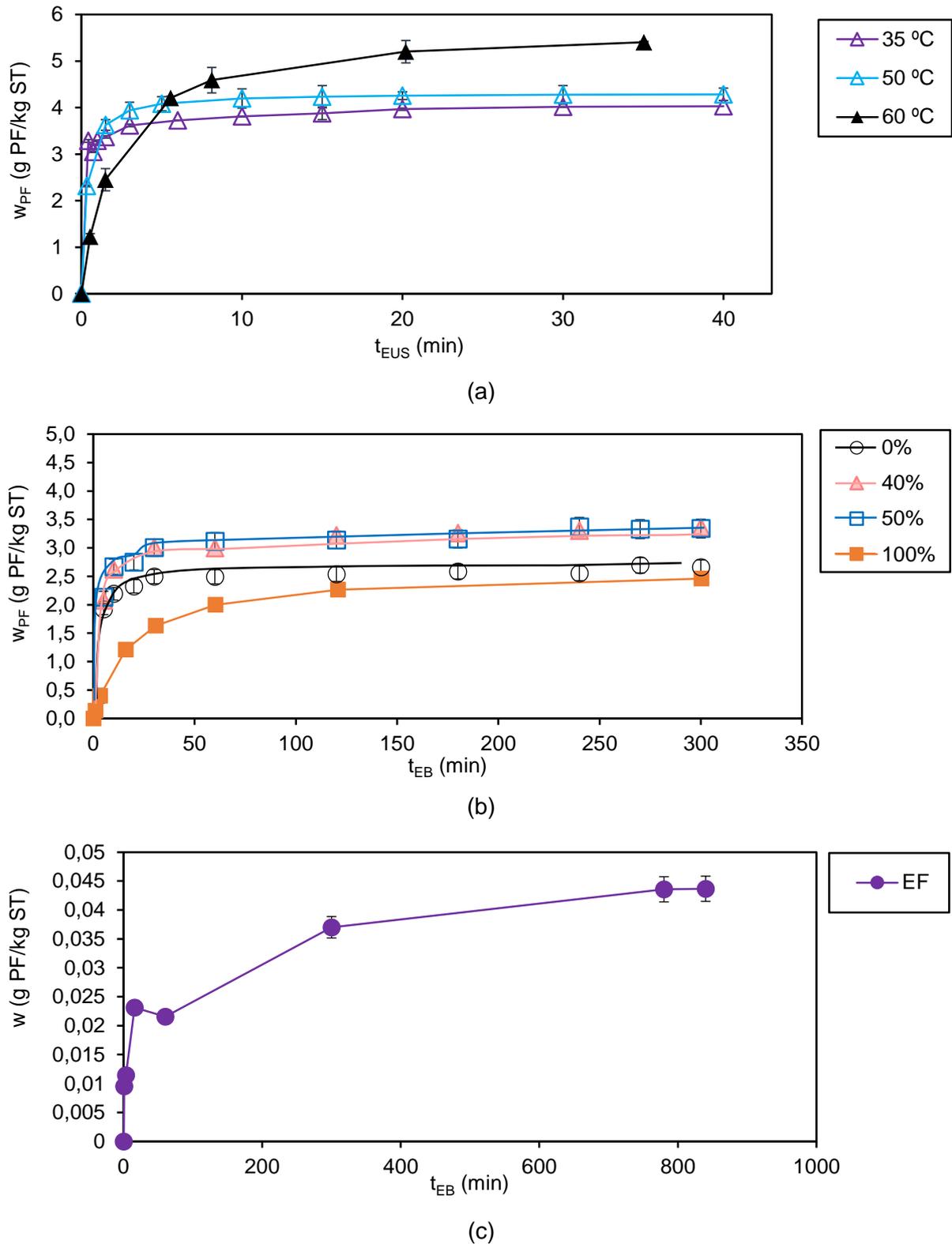


Figura 10. Resultados de las cinéticas de extracción de PF para el ST Cuarta (a) mediante EUS a distintas temperaturas utilizando como disolvente una mezcla etanol-agua al 50% en peso, (b) mediante EB a 60 °C utilizando mezclas de etanol-agua y (c) del etil ferulato (EF) mediante EB a 60 °C con 100% de etanol.

Para esta temperatura, las condiciones óptimas para la EB de PF se dieron a una concentración de etanol de 40 a 50%, obteniendo a los 300 min valores de en torno a 3 g PF/kg ST. Para concentraciones superiores, las cantidades de PF extraídas disminuían, como

se observa en el caso de la extracción con 100%, en la que se extrajo menor cantidad de PF que en la de 0% de etanol, siendo los valores de aproximadamente 2 g PF/kg ST y 2,5 g PF/kg ST, respectivamente. Con estos resultados, se determinó que la concentración experimental de etanol en el disolvente fuera de un 50%.

Cabe destacar que en el caso de la EB con 100% de etanol, tal y como se aprecia en la Tabla 1, el hecho de que haya menor cantidad de PF en el E_{final} ($3,3 \pm 0,1$ g PF/kg ST) que en el E_{final} de la EUS con tampón acetato a pH 5 sin agente enzimático ($4,05 \pm 0,05$ g PF/kg ST), pero una capacidad antioxidante del mismo valor ($0,02 \pm 0,01$ mol $FeSO_4$ /kg ST), es un indicador de la presencia de algún tipo de polifenol con una capacidad antioxidante alta.

En la Fig 10 (c) se observa que el único polifenol que pudo ser detectado por el HPLC para este E_{final} fue el etil ferulato. El etil ferulato es un fenilpropanol soluble en etanol y derivado del ácido ferúlico [33, 34]. Aunque el ácido ferúlico tiene mayor capacidad antioxidante, al igual que este se caracteriza por sus propiedades fisicoquímicas, antioxidantes y antibacterianas que le otorgan interés no solo para la industria alimentaria, sino también en la farmacéutica y cosmética [6, 35, 36]. Por otro lado, tal y como se observa en las Tablas 1 y 2, la presencia de fracción proteica en este E_{final} no es significativa.

5.3.- RESULTADOS DE EXTRACCIÓN CON LA MEZCLA 50% AGUA-50% ETANOL

Bajo las condiciones óptimas establecidas en los apartados 5.1 y 5.2, los valores de PF en los extractos de ST Cuarta obtenidos por EUS ($5,4 \pm 0,1$ g PF/kg ST) fueron superiores a los obtenidos por la EB ($3,3 \pm 0,1$ g PF/kg ST). Al igual que sucedía con las extracciones con agentes enzimáticos, la ultrasonificación aumenta el grado de recuperación de la fracción polifenólica del ST extraído con disoluciones de etanol-agua, necesitando tiempos menores para obtener mayores cantidades de PF.

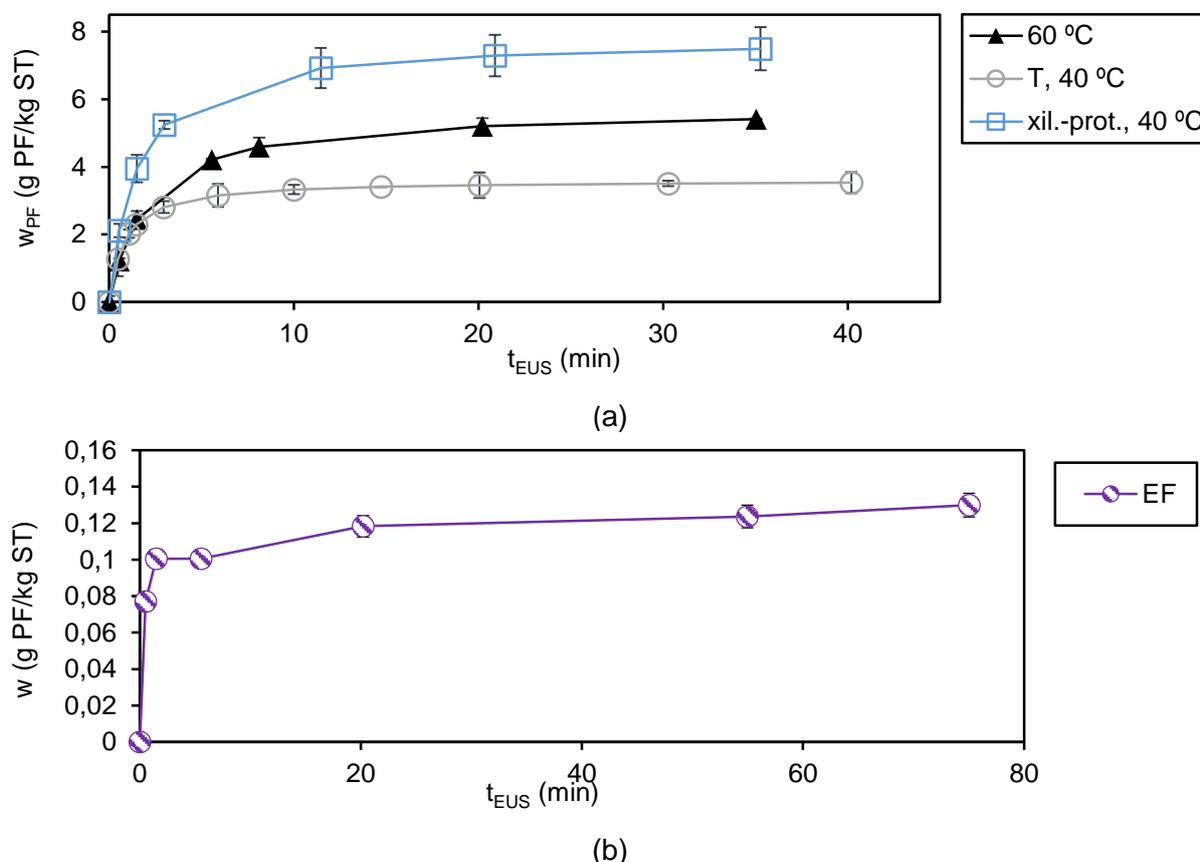


Figura 11. Resultados de las cinéticas de extracción en el ST Cuarta (a) de PF mediante EUS con 50 % de etanol a 60 °C, con tampón acetato a pH 5 sin agente enzimático (T) y con xil.-prot. a 40 °C y (b) de etil ferulato (EF) mediante EUS con 50 % de etanol a 60 °C.

La Fig. 11 (a) y los resultados recogidos en la Tabla 1 del apartado 4.3 reflejan que los E_{final} de ST Cuarta extraídos mediante una EUS con un 50 % de etanol en el disolvente, alcanzan una mayor cantidad de PF ($5,70 \pm 0,1$ g PF/kg ST) que las extraídas por EUS con tampón acetato a pH 5 sin agente enzimático ($4,05 \pm 0,05$ g PF/kg ST). Sin embargo, el valor de PF extraídos mediante EUS con xil.-prot. en el E_{final} del ST Cuarta continúa siendo el más elevado ($7,82 \pm 0,05$ g PF/kg ST). Esto es consecuencia de que la mayor parte de los PF del ST son solubles en agua y no en etanol [5]. En el caso de la capacidad antioxidante obtenida por el método FRAP, los resultados se ven justificados, ya que el valor superior lo presenta el E_{final} de la EUS con xil.-prot. ($0,11 \pm 0,01$ mol FeSO_4 /kg ST), seguido por el de la EUS con 50 % de etanol en el disolvente ($0,04 \pm 0,01$ mol FeSO_4 /kg ST) y por el de la EUS con tampón acetato a pH 5 sin agente enzimático ($0,02 \pm 0,01$ mol FeSO_4 /kg ST).

En la Fig. 11 (b) se observa que la cantidad de etil ferulato que, al igual que sucedió en la EB con 100% de etanol, fue el único tipo de polifenol que se pudo detectar por HPLC en el E_{final} de la EUS con 50% de etanol a 60 °C.

En cuanto a la fracción proteica, el E_{final} del ST Cuarta extraído mediante EUS con 50% de etanol presenta unos valores de contenido en P de $1,09 \pm 0,2$ $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ST y unos valores de contenido en aa de $7,1 \pm 0,2$ $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ST. Estos resultados, como se puede ver en la Tabla 1, no son comparables con los obtenidos para el resto de E_{final} de ST Cuarta analizados.

Estos resultados son tan bajos debido a que muy pocas proteínas son solubles en etanol. Las gliadinas, son proteínas del gluten que presentan un gran número de aminoácidos lipófilos que les otorgan capacidad de formar puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, permitiendo que puedan disolverse en soluciones alcohólicas [28], por lo que la mayoría de las proteínas extraídas pertenecerán a este grupo. En cuanto a la concentración de aminoácidos, como se observa en la Fig. 12, es significativamente menor que en el resto de extracciones, esto es consecuencia de la poca disolución que presentan las proteínas en el etanol.

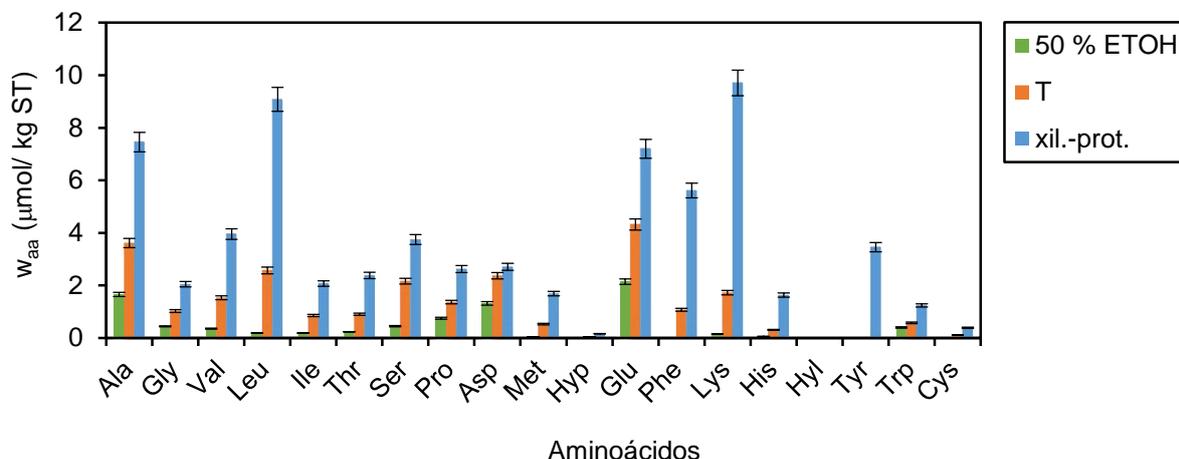


Figura 12. Resultados del contenido de aa del E_{final} del ST Cuarta tras la EUS con 50% de etanol a 60 °C, con tampón acetato a pH 5 (T) y con xil.-prot.

6.- CONCLUSIONS

As has been seen throughout this final project, wheat bran is a by-product of the food industry whose revaluation would certainly be of interest, not only for its polyphenol content and its antioxidant capacity, but also for its vitamin and mineral content and its content in essential amino acids. Finally, the main conclusions drawn are as follows:

1. The technical effectiveness of the ultrasound-assisted enzymatic extraction process is higher in comparison with conventional ultrasound extraction and with the bath

extraction process, since the initial extraction speed (h) and the concentration of polyphenols obtained on reaching equilibrium (w_s) are higher in this case.

2. In relation to the previous aspect, the efficiency of polyphenol extraction is improved when the enzymes used correspond to the mixture of xylanase (1,1%) and protease (1,5%) enzymes, with respect to the cellulase enzyme (10%), since xylanases are capable of breaking the arabinoxylan chains, to which the ferulic acid and other polyphenols are bound. In the case of ethanol-water solvent extractions, the extraction of polyphenols is also lower than the one given with the xylanase-protease enzyme mixture. The lowest extraction was the one of the 100% ethanol extraction.
3. The content of total polyphenols and, as a consequence, the antioxidant capacity were very similar between the three types of wheat bran, ranging from 3,0-4,0 g PF/kg WB for the extractions without enzyme and 7,1-7,8 g PF/kg WB for the extractions with the xylanase-protease mixture.
4. The polyphenols found were different in the three types of bran. In all cases, the major ones were gallic and ferulic acid. In powdered wheat bran, the presence of vanillic acid in the extraction without enzymes is noteworthy, the concentration of which is increased in the extraction with the xylanase-protease mixture. In the granulated wheat bran, after enzymatic extraction, vanillic acid also appears and in the powdered wheat bran, syringic aldehyde appears.
5. In the extraction with the ethanol-water solvent, it was observed the presence of a polyphenol that did not appear previously, the ethyl ferulate, which, like ferulic acid, has physicochemical, antioxidant and antibacterial properties that make this polyphenol interesting for its use in different food, cosmetic and pharmaceutical industries.
6. The protein content was considerably higher in the extractions of the powdered wheat bran, which may be a consequence of its type of milling. As for the extracts obtained with ethanol-water solutions, their protein content was negligible.
7. The main essential amino acids found in the different wheat bran were leucine and lysine. The powdered wheat bran also contained valine. The concentrations of these essential amino acids were higher in the enzymatic extraction with xylanase-protease and especially in the powdered wheat bran, followed by granulated wheat bran and leaf wheat bran.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Prückler, S. Siebenhandl, S. Apprich, S. Höltinger, C. Haas, E. Schmid, W. Kneifel (2014). Wheat bran-based biorefinery 1: composition of wheat bran and strategies of functionalization. *LWT-Food Science and Technology* 56: 211-221.
- [2] L. Stevenson, F. Phillips, K. O'sullivan, J. Walton (2012). Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 63 (8): 1001-1013.
- [3] G. A. Williams (1927). A study of the laxative action of wheat bran. *The American Journal of Physiology* 83 (1).
- [4] B. Verma, P. Hucl, R.N. Chibbar (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry* 116: 947-954.
- [5] S. Arranz (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: metodología para su determinación e identificación. Memoria para optar al grado de Doctor. Departamento de Bromatología II de la Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- [6] M. Ferri, A. Happel, G. Zanaroli, M. Bertolini, S. Chiesa, M. Commisso, F. Guzzo, A. Tassoni (2020). Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran. *New biotechnology* 56: 38-45.

- [7] N. De Brier, S.V. Gomand, I. Celus, C.M. Courtin, K. Brijis, J.A. Delcour (2015) Extractability and Chromatographic Characterization of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Bran Protein. *Journal of Food Science* 80 (5): 967-974.
- [8] W. H. Idris, E. E. Babiker, A. H. El Tinay (2003). Fractionation, solubility and functional properties of wheat bran proteins as influenced by pH and/or salt concentration. *Nahrung/ Food* 47 (6): 425-429.
- [9] G. Chaquilla, R. R. Baladrán, J. A. Huerta, G. Ramos, J. G. Luna (2018). Identification of proteins contained in aqueous extracts of wheat bran through a proteomic approach. *Journal of Cereal Science* 80: 31-36.
- [10] K. H. Kim, R. Tsao, R. Yang, S. W. Cui (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* 95: 466-473.
- [11] M. Ortiz (2019). Recuperación de compuestos fenólicos de salvados de trigo mediante un proceso de extracción enzimática y ultrasonificación. Trabajo de Fin de Máster. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Ciencias. Universidad de Burgos.
- [12] V. Nour, I. Trandafir, S. Cosmulescu (2016). Optimization of ultrasound-assisted hydroalcoholic extraction of phenolic compounds from walnut leaves using response Surface methodology. *Pharmaceutical Biology* 54 (10): 2176-2187.
- [13] D. Franco, J. Sineiro, M. Rubilar, M. Sánchez, M. Jerez, M. Pinelo, N. Costoya, M. J. Núñez (2008). Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 7 (8): 3210-3216.
- [14] P. Panja (2017). Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials. *Current Opinion in Food Science* 17: 173-182.
- [15] C. D. Nandini, P. V. Salimath (2001). Carbohydrate composition of wheat, wheat bran, sorghum and bajra with good chapati/ roti (Indian flat bread) making quality. *Food Chemistry* 73: 197-203.
- [16] J. Wang, B. Sun, Y. Liu, H. Zhang (2014). Optimisation of ultrasound-assisted enzymatic extraction of arabinoxylan from wheat bran. *Food Chemistry* 150: 482-488.
- [17] Z. Rodríguez, M. Robaina, U. J. Jáuregui, A. Blanco (2014). Empleo de la radiación ultrasónica para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectivas. *Revista CENIC Ciencias químicas* 45: 139-147.
- [18] S. Zhou, X. Liu, Y. Guo, Q. Wang, D. Peng, L. Cao (2010). Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction. *Carbohydrate Polymers* 81: 784-789.
- [19] M. Bataillon, P. Mathaly, A. P. Nunes, F. Duchiron (1998). Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale. *Industrial Crops and Products* 8: 37-43.
- [20] C. Anderson, S. Simsek (2019). Mechanical profiles and topographical properties of films made from alkaline extracted arabinoxylans from wheat bran, maize bran, or dried distillers grain. *Food Hydrocolloids* 86: 78-86.
- [21] E. Arte, X. Huang, E. Nordlund, K. Katina (2019). Biochemical characterization and technofunctional properties of bioprocessed wheat bran protein isolates. *Food Chemistry* 289: 103-111.

- [22] C. Santo Domingo, M. Soria, A. M. Rojas, E. N. Fissore, L. N. Gerschenson (2015). Protease and Hemicellulase Assisted Extraction of Dietary Fiber from Wastes of *Cynara cardunculus*. *International Journal of Molecular Sciences* 16: 6057-6075.
- [23] W. Liu, M. A. Brennan, L. Serventi, C. S. Brennan (2017). Effect of cellulose, xylanase and alfa-amylase combinatioins on the rheological properties of Chinese steamed bread dough enriched in wheat bran. *Food Chemistry* 234: 93-102.
- [24] S. N. Onyeneho, N. S. Hettiarachchy (1992). Antioxidant Activity of Durum Wheat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 1496-1500.
- [25] K. Zhou, L. Su, L. Yu (2004). Phytochemicals and Antioxidant Properties in Wheat Bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 6108-6114.
- [26] J. Rosicka, A. Komisarczyk, E. Nebesny (2018). Heteropolysaccharide preparations from rye and wheat bran as sources of antioxidants. *Journal of Cereal Science* 81: 37-43.
- [27] V. Urías, J. B. Heredia, D. M. Rangel, G. Niño (2016). Ácidos fenólicos con actividad antioxidante en salvado de maíz y salvado de trigo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 3 (7): 43-50.
- [28] R. R. Balandrán, J. N. Mercado y A. M. Mendoza (2015). Wheat bran proteins: a review of their uses and potential. *Food Reviews International* 31 (3).
- [29] J. L. Andreotti, D. Carpiné, M. L. Corazza (2015). Extraction of soybean oil using etanol and mixtures with alkyl esters (biodiesel) as co-solvent: kinetics and thermodynamics. *Industrial Crops and Products* 74: 69-75.
- [30] L. Rakotondramasy, J. L. Havet, C. Porte, H. Fauduet (2007). Solid-liquid extraction of protopine from *Fumaria officinalis* L.-Analysis determination, kinetic reaction and model building. *Separation and Purification Technology* 54: 253-261.
- [31] N. N. Rosa, C. Barron, C. Gaiani, C. Dufour, V. Micard (2013). Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *Journal of Cereal Science* 57: 84-90.
- [32] I. Membrillo, C. Sánchez, M. Meneses, E. Favela, O. Loera (2011). Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* 102: 1581-1586.
- [33] F. V. Macedo, A. Gomes, P. S. da Silva, A. A. da Silva, F. de Assis, L. C. Cunha (2019). Systematic review and technological prospection: ethyl ferulate, a phenylpropanoid with antioxidant and neuroprotective actions. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29 (2): 73-83.
- [34] G. Scapagnini, D. A. Butterfield, C. Colombrita, R. Sultana, A. Pascale, V. Calabrese (2004). Ethyl Ferulate, a Lipophilic Polyphenol, Induces HO-1 and Protects Rat Neurons Against Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 6 (5): 811-818.
- [35] M. Karamac, L. Koleva, V. D. Kancheva, R. Amarowicz (2017). The Structure-Antioxidant Activity Relationship of Ferulates. *Molecules*, 22 (4): 527-534.
- [36] A. Aljawish, I. Chevalot, J. Jasniewski, A. M. Revol, J. Scher, L. Muniglia (2014). Laccase-catalysed functionalisation of chitosan by ferulic acid and ethyl ferulate: evaluation of physicochemical and biofunctional properties. *Food Chemistry* 161: 279-287.