

La proteólisis con V8 de una fracción de bajo peso molecular de extracto acuoso de salvado de trigo promueve la formación de nanoesferas fusionadas

V8 proteolysis of a low molecular weight fraction of aqueous wheat bran extract promotes the formation of fused nanospheres.

Chaquilla-Quilca, G. ^{1,5} , Balandrán-Quintana, R.R. ^{1*} , Mendoza-Wilson, A.M. ¹ ,
Azamar-Barrios, J.A. ² , Ramos-Clamont Montfort, G. ³ , López-Franco, Y.L. ⁴ ,
Luna-Valdez, J.G. ⁶ , Huerta-Ocampo, J.A. ³ 

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, 83304, Hermosillo, Son., México. ² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN-Unidad Mérida. Carretera Antigua a Progreso Km. 6, 97310 Mérida, Yucatán. ³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Ciencia de Los Alimentos. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, 83304, Hermosillo, Son., México. ⁴ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, 83304, Hermosillo, Son., México. ⁵ Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Facultad de ingeniería, EAP Ing. Agroindustrial. Abancay, Apurímac, Perú. ⁶ Universidad Autónoma de Occidente. Los Mochis, Sin., México.



Please cite this article as/Como citar este artículo: Chaquilla-Quilca, G., Balandrán-Quintana, R.R., Mendoza-Wilson, A.M., Azamar-Barrios, J.A., Ramos-Clamont Montfort, G., López-Franco, Y.L., LunaValdez, J.G., Huerta-Ocampo, J.A. (2023). V8 proteolysis of a low molecular weight fraction of aqueous wheat bran extract promotes the formation of fused nanospheres. *Revista Bio Ciencias*, 10, e1503. <https://doi.org/10.15741/revbio.10.e1503>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: May 01th 2023.

Accepted/Aceptado: July 18th 2023.

Available on line/Publicado: August 31th 2023.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue explorar si la formación de nanopartículas proteicas, reportadas en un estudio previo, ocurre en una fracción de un extracto acuoso de salvado de trigo con composición particular. Utilizando una estrategia de abajo hacia arriba, primero se fraccionó un extracto acuoso de salvado de trigo mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Cada una de las fracciones cromatográficas se hidrolizó con la proteasa V8 en un medio de reacción conteniendo Ca^{2+} . Las fracciones cromatográficas y los hidrolizados de las mismas se sometieron a caracterización química, electroforesis, espectroscopía UV-Vis, espectroscopía infrarroja y microscopía electrónica de barrido. Se obtuvieron seis fracciones cromatográficas de 0.3 a 102.8 kDa. Los resultados de la caracterización química y espectroscópica revelaron la presencia de complejos proteína-polisacárido-ácido ferúlico en cuatro de las fracciones. En el hidrolizado de una fracción de 15.1 kDa se encontraron nanoesferas fusionadas longitudinalmente, formando cadenas. Ocasionalmente, la fusión se dio en diferentes ángulos, proporcionando sitios de unión para ramificaciones. Se discute cómo la composición de dicha fracción y los iones Ca^{2+} añadidos podrían determinar tanto la formación de las nanoesferas como su arreglo.

PALABRAS CLAVE: Nanotecnología de proteínas, Salvado de trigo, Fraccionamiento de proteínas, Usos alternativos de proteínas, Péptidos.

*Corresponding Author:

René Renato Balandrán-Quintana. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas No. 46, 83304, Hermosillo, Son., México.

Teléfono: (662) 2892400x450. E-mail: rbalandran@ciad.mx

ABSTRACT

The objective of this work was to explore whether the formation of protein nanoparticles, reported in a previous study, occurs in a fraction of an aqueous extract of wheat bran with a particular composition. Using a bottom-up strategy, an aqueous extract of wheat bran was first fractionated by size exclusion chromatography. Each of the chromatographic fractions was hydrolyzed with V8 protease in a reaction medium containing Ca^{2+} . The chromatographic fractions and their hydrolysates were subjected to chemical characterization, electrophoresis, UV-Vis spectroscopy, infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy. Six chromatographic fractions from 0.3 to 102.8 kDa were obtained. The chemical and spectroscopic characterization results revealed the presence of protein-polysaccharide-ferulic acid complexes in four of the fractions. In the hydrolysate of a 15.1 kDa fraction, longitudinally fused nanospheres were found, forming chains. Occasionally, fusion occurred at different angles, providing attachment sites for branching. It is discussed how the composition of this fraction and the added Ca^{2+} ions could determine both the formation of the nanospheres and their arrangement.

KEY WORDS: Protein nanotechnology, Wheat bran, Protein fractionation, Protein alternative uses, Peptides.

Introducción

La estructura química fácilmente ajustable de las proteínas y su biocompatibilidad permiten el desarrollo de sistemas funcionales únicos. Entre estos destacan las nanopartículas proteicas (PN), que son de interés para las industrias alimentaria y farmacéutica como vehículos para el transporte y la liberación de fármacos y compuestos bioactivos (Zhang *et al.*, 2023). Las fuentes de proteína para producir PN pueden ser de origen animal o vegetal (Kianfar, 2021), destacando los subproductos agroindustriales debido al uso sustentable que puede hacerse de ellos (Álvarez-Castillo *et al.*, 2021). Entre los subproductos agroindustriales estudiados para hacer PN se encuentran la soya (Yuan *et al.*, 2023), el suero de leche de bovinos (Liu *et al.*, 2022), el salvado de arroz (Peng *et al.*, 2017), las plumas de pollo (Saleh *et al.*, 2020), el salvado de trigo (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2016), las hojas de té (Ren *et al.*, 2020), las harinas de gluten provenientes de la molienda húmeda de cereales, así como los subproductos de la destilación de etanol y el bagazo de la cerveza (Tapia-Hernández *et al.*, 2019).

Las estrategias para producir PN incluyen métodos físicos y químicos, así como hidrólisis enzimática controlada. Los dos primeros son agresivos para las mismas proteínas y de alto costo energético, mientras que la hidrólisis enzimática se realiza en condiciones leves y puede

ser altamente selectiva, liberando péptidos con secuencias específicas (Shen *et al.*, 2020). Los péptidos liberados por proteólisis actúan como bloques de construcción que se auto ensamblan espontáneamente para formar PN, cuya morfología depende de la secuencia de aminoácidos de los péptidos (Mandal *et al.*, 2014). Las PN auto ensambladas se estabilizan mediante interacciones no covalentes (Li *et al.*, 2022) y, en ocasiones, mediante la formación de puentes con cationes divalentes (Graveland-Bikker *et al.*, 2004).

Entre las proteasas altamente selectivas se encuentra la proteasa V8 (también conocida como endoproteinasa Glu-C), que en búfer de fosfatos a pH 7.8 escinde específicamente en residuos de ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) (Drapeau *et al.*, 1972). En un estudio previo se reportó la formación de PN tubulares mediante hidrólisis, por proteasa V8, de un extracto acuoso de salvado de trigo rico en proteínas (WBAE). La hidrólisis se realizó en presencia de CaCl_2 como fuente de iones estabilizadores Ca^{2+} (Chaquilla-Quilca *et al.*, 2016). Se propuso un modelo para explicar la formación de las PN tubulares, pero no ha sido demostrado experimentalmente. En el presente trabajo se pretende explorar el aspecto mecanístico de la formación de dichas PN, dada la importancia que tiene desde el punto de vista de ciencia básica y en un contexto de sustentabilidad.

La heterogeneidad y complejidad del WBAE hace laborioso dilucidar los componentes y las interacciones moleculares involucradas en la formación de las PN. En una primera aproximación, se planteó la hipótesis de que las PN se forman en una fracción del WBAE con una composición particular. Para probar esta hipótesis se utilizó un método de abajo hacia arriba basado en el fraccionamiento del WBAE por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC por sus siglas en inglés). Las fracciones obtenidas se sometieron a proteólisis con V8 en presencia de Ca^{2+} para determinar cuál fracción o fracciones SEC del WBAE están involucradas en la formación de las PN. A partir de la caracterización química del WBAE y del análisis electroforético, espectroscópico y de microscopía electrónica de las fracciones SEC y de los hidrolizados, se propone un probable mecanismo de formación de las PN.

Material y Métodos

Materia prima

El salvado de trigo se obtuvo de un molino comercial en Hermosillo Son., México, el mismo día de su producción. El salvado se envasó inmediatamente en bolsas de polietileno y se almacenó a 5 °C hasta su uso, lo cual ocurrió no después de 2 semanas.

Obtención del extracto acuoso de salvado de trigo

El salvado de trigo se preparó de acuerdo con la metodología reportada por Chaquilla-Quilca *et al.* (2016). El salvado de trigo se tamizó a través de malla #40 (0.45 mm de apertura) y lo retenido en la malla se lavó con agua HPLC y se secó a 40 °C durante 18 h. Una vez seco, se extrajo con agua HPLC fría en una relación 1:10 p/v, a 5 ± 1 °C durante 3 h, con agitación

magnética en el interior de un refrigerador. Después, los sólidos se eliminaron por filtración a través de tela de organza y el filtrado se centrifugó a $5,500 \times g$ durante 20 min a 5°C . El sobrenadante se recuperó y se dializó contra agua ultrapura con una membrana con abertura de poro de 14 kDa, haciendo 3 intercambios de líquido en el transcurso de 24 h. El dializado se liofilizó y el polvo obtenido se identificó como WBAE y se almacenó a -40°C hasta su uso.

Determinaciones de proteínas

El contenido de proteína total se determinó por el método micro-Kjeldahl (955.04) de la AOAC (2005) utilizando un factor de conversión nitrógeno-proteína de 5.75. La proteína soluble fue estimada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Determinación de azúcares neutros

Los azúcares neutros se analizaron en el WBAE mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) para cuantificar la presencia de polisacáridos no amiláceos (Luna-Valdez *et al.*, 2017). Después de hidrolizar las muestras con HCl, los azúcares se separaron en una columna analítica Dionex-CarboPac PA10 (4×250 mm) y el instrumento de HPLC se equipó con un detector de pulsos amperométricos ED50. Se utilizaron agua y NaOH 0.3 M como eluyentes. Los azúcares neutros se identificaron comparando los tiempos de elución de las muestras con los de azúcares estándar del kit 29,387-3 (Aldrich Chemical Company Inc., WI, USA).

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

La SEC se realizó en una columna preparativa XK70 (16×700 mm) rellena con Superdex 75 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, SWE), de acuerdo con el método reportado por Luna-Valdez *et al.* (2019). El WBAE, preparado en búfer fosfato de sodio 50 mM al 10 % p/v, se inyectó en la columna y se eluyó con fosfato de sodio 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.2, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Se recuperaron eluatos de 0.75 mL y se leyó la absorbancia a 280 nm (Abs_{280}) de cada uno de los mismos en un espectrofotómetro Cary 60 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Se obtuvo el cromatograma SEC graficando Abs_{280} vs volumen. Cada pico del cromatograma se consideró una fracción SEC, cuyo peso molecular se calculó mediante una curva estándar construida con proteínas de peso molecular conocido (GE Healthcare Bio-Sciences). Los eluatos de cada fracción SEC se agruparon y cada conjunto se dializó frente a agua ultrapura con una membrana con abertura de poro de 14 kDa. Después de estimar el contenido de proteína soluble, todas las fracciones se liofilizaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Se realizaron 30 corridas cromatográficas a través de la columna, para reunir suficiente cantidad de cada fracción SEC antes de realizar las caracterizaciones y el experimento de hidrólisis.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para determinar los perfiles de masas moleculares de las proteínas en las fracciones SEC y el WBAE, estos se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), en condiciones reductoras y desnaturalizantes, según la metodología de

Laemmli (1970). En los pocillos del gel se cargaron muestras con 15 µg de proteína, excepto de F4 y F5 ya que, debido a las concentraciones mínimas de proteína en estas fracciones, se hizo lo posible por cargar el máximo sin exceder del volumen permitido por los pocillos. Se utilizaron geles preparados al 14 % y cada corrida se realizó aplicando una corriente de 15 mA por gel en un equipo Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). La masa molecular relativa de las proteínas en los geles se estimó por comparación con el marcador de peso molecular Precision Plus de Bio-Rad (Cat. 161-0374). Todos los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 al 1 % (Bio-Rad) en metanol al 30 % y ácido acético al 10 % y se documentaron en el sistema Gel Doc™ XR+ de Bio-Rad.

Fenoles totales

Para la determinación de compuestos fenólicos totales en las fracciones SEC se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, según la metodología reportada por Xu & Chang (2007). El contenido de fenoles totales se calculó a partir de una curva estándar de ácido gálico. Las determinaciones se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como mg de fenoles totales en equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de muestra (mg EGA/100 g).

Espectroscopía UV-Vis

Con el objetivo de respaldar la caracterización química, se obtuvieron los espectros UV-Vis de las soluciones de WBAE y de las fracciones SEC, preparadas en búfer de fosfato de sodio 50 mM. También se obtuvo el espectro UV-Vis del búfer de fosfato, como control. Los barridos se hicieron en el rango de 200 a 800 nm en un espectrofotómetro Cary 60.

Proteólisis con proteasa V8

Las fracciones SEC y el WBAE se sometieron a proteólisis con V8 en un medio de reacción en presencia de Ca^{2+} , según la metodología reportada por Chaquilla-Quilca *et al.* (2016). La proteasa V8, EC 3.4.21.19 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), el WBAE y cada una de las fracciones SEC se prepararon por separado en búfer Tris- PO_4 0.1 M, pH 7.8. La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo, en los que se mezclaron las muestras, la proteasa V8 y el CaCl_2 en una relación molar de 62.5:2:2000 en base proteica. También se corrieron muestras control, sin CaCl_2 ni V8. Después de mezclar manualmente con suavidad, los tubos se incubaron durante 4 h a 37 °C en un baño de agua (VWR International, Radnor, PA). La reacción se detuvo sumergiendo los tubos de ensayo en agua a 100 °C durante 10 min, luego los tubos se enfriaron en un baño de hielo y los hidrolizados se congelaron a -40 °C y se liofilizaron. Los hidrolizados liofilizados se identificaron como F1H, FintH, F2H, F3H, F4H y F5H, mientras que los controles se identificaron como CF1, CFint, CF2, CF3, CF4 y CF5. Todas las muestras se almacenaron a -40 °C en tubos cónicos de 2 mL tapados, hasta su uso.

Espectroscopía infrarroja

La identificación de grupos funcionales en los liofilizados de las fracciones SEC y de las fracciones SEC hidrolizadas se realizó mediante espectroscopía infrarroja con transformada de

Fourier (FTIR) en un espectrómetro Nicolet FT-IR iS50 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Los espectros se corrieron en el rango de 400 a 4,000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . Cada espectro fue el resultado de 64 barridos y se obtuvo graficando la transmitancia vs el número de onda.

Microscopía electrónica de barrido

La morfología de las partículas obtenidas en los hidrolizados se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Cada muestra se disolvió en agua desionizada y se sonicó durante 10 min. Luego se colocó una gota de muestra en un soporte y se secó al aire a temperatura ambiente. Cada muestra se cubrió con una capa de Au-Pd y se visualizó en un microscopio JEOL (FESEM-7600, Tokio, Japón) a 2.0 kV. También se visualizaron las muestras control, preparadas mediante la misma metodología que los hidrolizados.

Análisis estadístico de datos

Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado y se presenta el valor medio y su desviación estándar.

Resultados y Discusión

Caracterización del WBAE

Contenido de proteínas

Luego de la extracción acuosa, diálisis y liofilización, se obtuvo un extracto acuoso de salvado de trigo con 47 ± 0.6 % de proteína total en peso. Este es un valor cercano al reportado por Chaquilla-Quilca *et al.* (2016), lo que indica la reproducibilidad del método respecto a la extracción de proteínas.

Contenido de azúcares neutros

La relación arabinosa/xilosa (Ara/Xyl) indica el número de unidades de Ara unidas al esqueleto de Xyl y se utiliza de forma rutinaria para la determinación de arabinoxilanos en una muestra biológica (Morales-Ortega *et al.*, 2013). Por otro lado, la relación arabinosa/galactosa (Ara/Gal) ayuda a identificar los arabinogalactanos (Saeed *et al.*, 2011), a menudo representados como un esqueleto lineal de Gal con ramificaciones laterales cortas de diferentes azúcares, principalmente Ara (Fincher *et al.*, 1983). La Tabla 1 muestra la composición de azúcares neutros del WBAE, donde la glucosa (Glc) fue la más abundante. Los contenidos de Gal y Xyl fueron la mitad de los de Glc, mientras que el contenido de Ara fue el más bajo, con menos de una cuarta parte del correspondiente a Glc. En salvado de trigo están reportados los azúcares neutros Ara, Gal, Glc y Xyl (Maes & Delcour, 2002; Hollmann *et al.*, 2009), así como en el WBAE (Luna-Valdez *et al.*, 2017). En el presente trabajo, estos azúcares pertenecen a los polisacáridos extraíbles en agua, como el almidón, los β -glucanos, los arabinoxilanos o los arabinogalactanos (Loosvel *et al.*, 1997). Los dos últimos suelen estar unidos a péptidos y proteínas a través de enlaces covalentes (Fincher *et al.*, 1983; Cipriani *et al.*, 2009).

Tabla 1. Contenido de azúcares neutros del extracto acuoso de salvado de trigo (WBAE); masa molecular, contenido de proteína soluble y fenoles totales de las fracciones SEC.

Contenido de azúcares neutros del WBAE (mg/kg)		Masa molecular (MM), contenido de proteína soluble y fenoles totales de las fracciones SEC			
		Fracción SEC	MM (kDa) ^a	Proteína (mg/mL) ^b	Fenoles totales (mg EGA/100 g) ^c
Arabinosa	8.75	F1	102.8	0.36	536 ± 35
Galactosa	15.31	Fint	58.4	0.35	419 ± 2
Glucosa	36.47	F2	15.1	1.00	820 ± 155
Xylosa	17.71	F3	6.9	0.52	861 ± 67
Relaciones		F4	2.4	0.12	274 ± 12
Ara/Xyl	0.49	F5	0.3	0.01	nd ^d
Ara/Gal	0.55				

^aMasa molecular determinada por SEC; ^bMétodo de Bradford; ^cMétodo de Folin-Ciocalteau; ^dnd = no detectado.

La relación Ara/Xyl del WBAE (Tabla 1) fue muy aproximada a lo reportado por Maes & Delcour (2002) y Khan & Shewry (2009), quienes informaron relaciones de 0.45 para los arabinoxilanos extraíbles en agua del salvado de trigo y 0.60 para el grano de trigo integral, respectivamente. Así, se confirma la presencia de arabinoxilanos en el WBAE. Por otro lado, la relación Ara/Gal (Tabla 1) es similar a la reportada por Izydorczyk *et al.* (1991) para arabinogalactanos extraíbles en agua de trigo (0.66 a 0.75), por lo que se confirma su presencia en el WBAE.

En el presente trabajo el contenido de Xyl fue superior al de Ara, a diferencia de lo reportado por Luna-Valdez *et al.* (2017), así que la relación Ara/Xyl se invierte (1.6 vs 0.49, respectivamente). Los arabinoxilanos del pericarpio externo son de bajo peso molecular, fácilmente extraíbles con agua y tienen una relación Ara/Xyl superior a 1.0 (Antoine *et al.*, 2003). Los extractos reportados por Luna-Valdez *et al.* (2017) no fueron dializados, por lo que, en el presente estudio, posiblemente los arabinoxilanos de bajo peso molecular fueron eliminados durante la diálisis.

Contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de fenoles totales en el WBAE fue de $1,430 \pm 2.0$ mg EGA/100 g. Los compuestos bioactivos más representativos del salvado de trigo son los ácidos fenólicos y los flavonoides. Entre los primeros, el más abundante es el ácido ferúlico. Ambos compuestos son muy difíciles de extraer, por su insolubilidad y porque forman complejos con los polisacáridos no amiláceos (Călinoiu & Vodnar, 2019). Lo más probable es que la mayor parte de los compuestos fenólicos en el WBAE corresponda a ácido ferúlico esterificado a arabinoxilanos, pues estos últimos son solubles en agua.

La presencia de proteínas, arabinoxilanos, arabinogalactanos y compuestos fenólicos, confirma la complejidad química del WBAE y sugiere que estos componentes se encuentran formando complejos macromoleculares. Por lo tanto, en la formación de PN podrían estar involucrados varios componentes, cada uno con una función particular.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

El WBAE se separó en seis fracciones SEC, identificadas como F1, Fint, F2, F3, F4 y F5, como se muestra en la Figura 1, con un perfil de masas moleculares de 0.3 a 102.8 kDa (Tabla 1). Estos resultados son similares a los encontrados para WBAE por Luna-Valdez *et al.* (2019). También son aproximados a lo reportado por De Brier *et al.* (2015), quienes reportaron masas moleculares en el rango de 14.4 a 97 kDa después del fraccionamiento de albúmina/globulina de salvado de trigo mediante cromatografía HPLC de exclusión por tamaño.

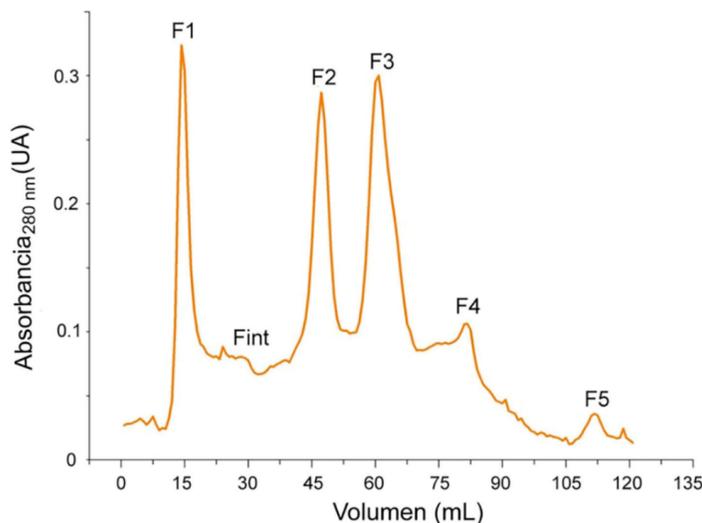


Figura 1. Cromatograma obtenido de las corridas de cromatografía de exclusión por tamaño, mostrando que el extracto acuoso de salvado de trigo (WBAE) se separó en 6 fracciones.

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados del presente trabajo.

Caracterización de las fracciones SEC

Contenido de proteína soluble

Se detectó proteína soluble en todas las fracciones SEC (Tabla 1), siendo la fracción F2 la que tuvo el mayor contenido, seguida de F3. El contenido de proteína de F5 se considera como trazas. La obtención de dos fracciones en las que no existe al menos uno de los componentes mayoritarios o que al menos este se encuentre en cantidades mínimas, en este caso las proteínas, permite un proceso de discriminación entre fracciones, bajo el supuesto de que no en todas estas se formarán PN.

Contenido de fenoles totales

Los fenoles totales contenidos en el WBAE se distribuyeron en las fracciones SEC como se muestra en la Tabla 1. Los compuestos fenólicos se concentraron más en F3 y F2, seguidos de F1, Fint y F4, mientras que en la fracción F5 no fueron detectados (Tabla 1). La presencia de compuestos fenólicos en casi todas las fracciones tiene la siguiente explicación. El principal compuesto fenólico del salvado de trigo es el ácido ferúlico, frecuentemente esterificado a los arabinosilanos, los que a su vez forman complejos con las proteínas (Adams *et al.*, 2003). Por tanto, es congruente la presencia de compuestos fenólicos en las fracciones que contienen proteína, así como la relación de sus concentraciones. Es decir, las fracciones con mayor contenido de proteína son también las que contienen más compuestos fenólicos, como se reporta en la Tabla 1. Los compuestos fenólicos presentes en la fracción F5 corresponden probablemente a ácido ferúlico libre. Debido a impedimentos técnicos no fue posible cuantificar polisacáridos no amiláceos en las fracciones SEC ni caracterizar el perfil de compuestos fenólicos específicos. No obstante, la caracterización espectroscópica proporciona información valiosa en este sentido.

Espectroscopía UV-Vis

En la Figura 2 se muestran los espectros UV-Vis del WBAE y de las fracciones SEC. El espectro del WBAE se presenta como referencia, por lo que la discusión se dirige a los espectros de las fracciones. La Abs_{280} en F1, Fint, F2, F3 y F4 es típica de las proteínas, pero los compuestos fenólicos también pueden absorber en esta longitud de onda por lo que podría haber un traslape en las bandas de absorción. No obstante, las absorbancias en aprox. 220 nm y 340 nm ayudan a distinguir las proteínas de los fenoles. Los picos a 220 nm en F1, Fint, F2 y F3 se deben al enlace peptídico (Aitken & Learmonth, 2002) y este resultado está relacionado con el contenido de proteína soluble (Tabla 1). Por otro lado, los hombros a 340 nm en F1, Fint, F2, F3 y F4 son indicativos de ácido ferúlico esterificado (Hromádková *et al.*, 2013). El ácido ferúlico libre podría contribuir adicionalmente a la Abs_{280} en F1 a F4. Así, debido a la coexistencia de proteínas y ácido ferúlico esterificado, y de acuerdo con el contenido de azúcares neutros y la relación Ara/Xyl del WBAE (Tabla 1), se concluye que los arabinosilanos feruloilados están contenidos en F1, Fint, F2 y F3, unidos a las proteínas a través de un monómero de azúcar feruloilo (Obel *et al.*, 2003) como ya se discutió por Luna-Valdez *et al.* (2019). La fracción F4 consta de polisacáridos

de bajo peso molecular, probablemente cantidades menores de ácido ferúlico libre y proteína. El espectro de F5 es casi idéntico al del control, excepto por la débil absorbancia a 340 y 280 nm, por lo que en F5 no se descartan cantidades menores de arabinosilanos de bajo peso molecular y/o compuestos fenólicos, si bien estos últimos no fueron detectados por el método de Folin-Ciocalteu como se reportó en la Tabla 1.

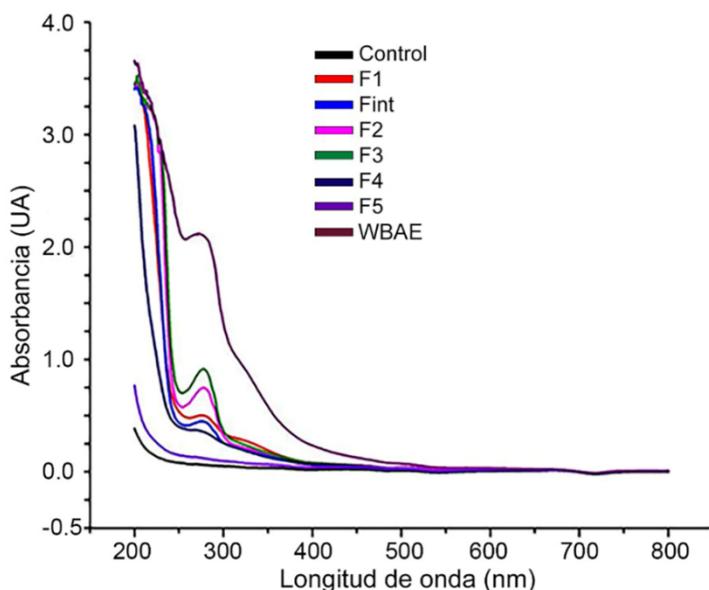


Figura 2. Espectros UV-Vis del extracto acuoso de salvado de trigo (WBAE) y de las fracciones SEC.

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados del presente trabajo.

Espectroscopía IR

En la Figura 3A se muestran los espectros IR de las fracciones SEC. La región de 800 a 1,200 cm^{-1} es la huella dactilar de los polisacáridos (Morales-Ortega *et al.*, 2013) y se amplía en la Figura 3B para una inspección más detallada.

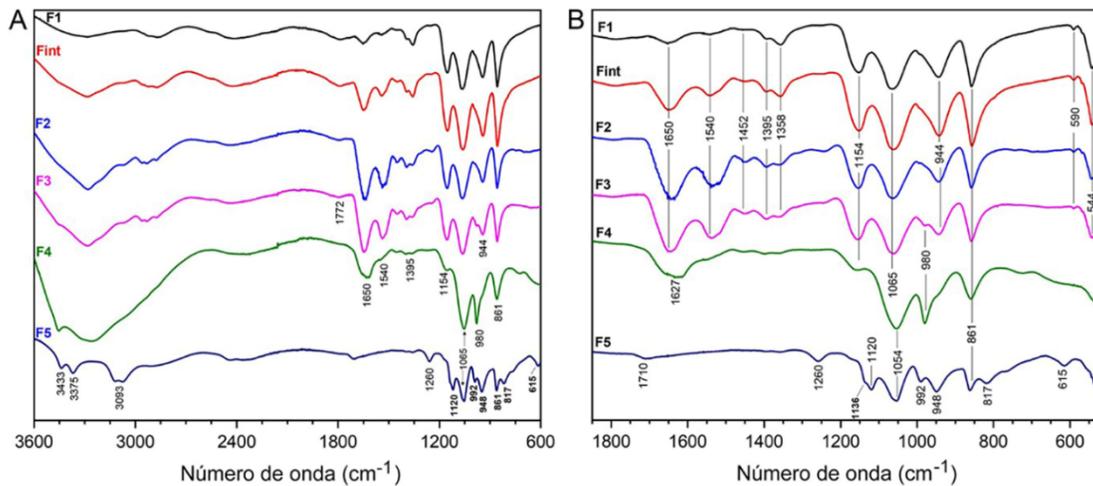


Figura 3. Espectros IR de las fracciones SEC de extracto acuoso de salvado de trigo (A). Ampliación de la región 800 – 1200 cm^{-1} de los mismos espectros IR (B).

Fuente: elaboración propia, con base en los resultados del presente trabajo.

La señal más intensa a $1,065 \text{ cm}^{-1}$ se asigna a la flexión C–OH (Barron & Rouau, 2008) y es muy cercana a la de (1→4)- β -xilanos (Robert *et al.*, 2005). El pico a $1,154 \text{ cm}^{-1}$, más intenso en F1, Fint, F2 y F3, se asigna al estiramiento asimétrico C–O–C del enlace glucosídico (Kačuráková & Wilson, 2001; Robert *et al.*, 2005), mientras que la señal de 944 cm^{-1} en F1 a F3 podría ser una señal desplazada de la configuración β del C1, que aparece en 895 cm^{-1} en xilanos cristalinos (Marchessault *et al.*, 1962). Las señales de $1,154 \text{ cm}^{-1}$ y 944 cm^{-1} son menos intensas en F4 que en F1, Fint, F2 o F3 y están ausentes en F5. Tal cambio de intensidad es característico de los arabinoxilanos con diferentes grados de sustitución; a mayor grado de sustitución, menor intensidad. Así, se confirma la presencia de arabinoxilanos en F1 a F4, indicando que aquellos en F4 tienen un mayor grado de sustitución de Ara en O3 (Robert *et al.*, 2005).

Las señales intensas a $1,065 \text{ cm}^{-1}$ y 980 cm^{-1} en el espectro de F4 indican un esqueleto de galactopiranososa con arabinofuranosa ramificada, por lo que se identifican arabinogalactanos en F4. El pico a 980 cm^{-1} es débil en F3 y está ausente en F1, Fint o F2, lo que indica que la mayoría de los arabinogalactanos están en F4. La señal cercana a $1,030 \text{ cm}^{-1}$ se asigna a los (1→4)- β -glucanos, por lo que estos, con diferentes pesos moleculares, no se descartan en todas las fracciones SEC. Los xilanos sustituidos con ácido glucurónico podrían estar en F4 y F5, asignados a la señal a $1,627 \text{ cm}^{-1}$ (Marchessault *et al.*, 1962), siempre que no haya proteínas presentes. Sin embargo, la señal de $1,627 \text{ cm}^{-1}$ también podría asignarse al estiramiento C=C y C=O de los compuestos fenólicos.

En los espectros de F1 a F4 se observan bandas de proteínas, características del estiramiento C=O ($1,650\text{ cm}^{-1}$) y el estiramiento N-H ($1,540\text{ cm}^{-1}$) (Barth, 2007). Estas bandas son más intensas en F2 y F3 y coinciden con la concentración de proteína (Tabla 1). La banda débil de $1,772\text{ cm}^{-1}$ es cercana a la de los ésteres aromáticos (Séné *et al.*, 1994), lo que sugiere un bajo grado de esterificación, posiblemente con ácido ferúlico, por lo que este último podría formar complejos con polisacáridos, en apoyo de lo ya discutido. Se observa un pico entre $2,800$ y $3,000\text{ cm}^{-1}$ y una banda ancha cerca de $3,400\text{ cm}^{-1}$ en los espectros de F1 a F4. El pico corresponde al estiramiento C-H de los carbohidratos, mientras que la banda ancha se encuentra en la región de estiramiento de los enlaces de hidrógeno poliméricos (Hollmann *et al.*, 2009) y es menos intensa en la fracción F1.

Existe una notable diferencia entre los espectros de F4 y F5 y los correspondientes a las demás fracciones. Los picos de proteínas no se ven en el espectro F5, lo cual concuerda con la casi ausencia de proteína en esta fracción. Por otro lado, la banda ancha en regiones cercanas a los $3,400\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento de los grupos OH y es característica de los enlaces de hidrógeno poliméricos (Hollmann *et al.*, 2009). En el espectro de F5, el pico a $1,260\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento C-OH de los fenoles, mientras que a $1,710\text{ cm}^{-1}$ implica un bajo grado de esterificación con ésteres aromáticos, como el ácido ferúlico (Séné *et al.*, 1994). La aparición de picos a $3,400$ - $3,000\text{ cm}^{-1}$, correspondientes al estiramiento de fenoles con C-H y O-H (Stuart, 2004), sugiere la presencia de compuestos fenólicos unidos a arabinosilanos en F5. Los arabinosilanos feruloilados tienen el ácido ferúlico unido a la posición de arabinosa O-5 a través de un enlace éster (Saulnier y Thibault., 1999).

Los resultados de la espectroscopía IR coinciden con los resultados del resto de las caracterizaciones. Se concluye que las fracciones F1, Fint, F2 y F3 consisten en complejos de proteína-polisacárido-ácido ferúlico, mientras que F4 y F5 contienen principalmente arabinosilanos esterificados con ácido ferúlico y/o arabinogalactanos, con cantidades menores de proteína.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

En la Figura 4 se muestran los resultados del análisis SDS-PAGE. Se observa un patrón de masa molecular decreciente de las fracciones SEC en la dirección F1 a F4, lo cual se corresponde con el análisis de cromatografía de exclusión por tamaño (Tabla 1). No obstante, y como era de esperarse, los valores absolutos de masa molecular entre los métodos SEC y SDS-PAGE son diferentes debido a la complejidad del WBAE. La masa molecular fue estimada por SEC a partir de los máximos de Abs_{280} de cada pico, pero cada fracción SEC contiene más de una proteína, como lo indican las varias bandas en los carriles de la Figura 4. Además, los arabinosilanos se esterifican con ácido ferúlico, lo que contribuye a la Abs_{280} de las fracciones SEC. También, las proteínas y los arabinosilanos forman complejos (Adams *et al.*, 2003), por lo que eluyen juntos a través de la columna SEC o del gel SDS-PAGE. Los carbohidratos pueden modificar sustancialmente la masa aparente debido a su influencia sobre el radio de Stokes de la proteína (Stafstrom & Staehelin, 1986).

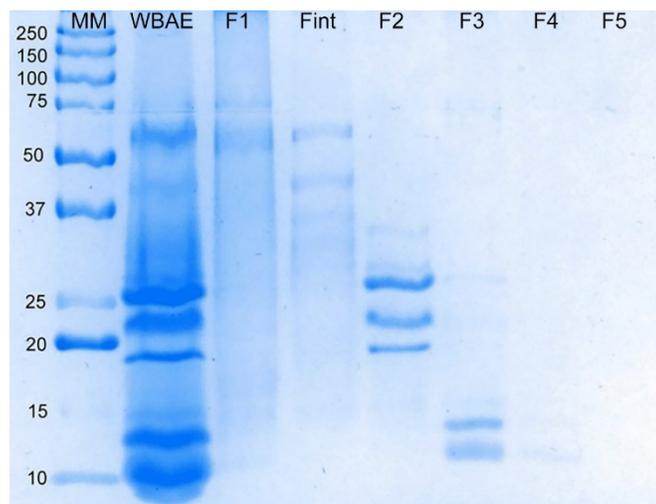


Figura 4. Gel SDS-PAGE con el perfil de masas moleculares del extracto acuoso de salvado de trigo (WBAE) y de sus fracciones separadas por cromatografía de exclusión de tamaño. MM: marcador molecular.

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados del presente trabajo.

En el carril de F4 se observa una banda muy tenue, mientras que en el carril de F5 no se reveló ninguna banda. Este resultado coincide con lo reportado para contenido de proteínas de F4 y F5 en la Tabla 1. El contenido de proteínas de F5 es tan insignificante que tal vez sólo sería posible revelarlo utilizando otro método de tinción, como la tinción con plata.

Los resultados cromatográficos y de electroforesis indican que la separación resultó en fracciones discernibles con relación a la presencia de proteínas. Esto es importante porque, de darse la formación de PN en alguna de las fracciones que contienen proteínas, el análisis de la secuencia de aminoácidos de estas facilitaría elucidar los mecanismos de formación de las PN.

Caracterización de hidrolizados

Espectroscopía IR

Los espectros IR de las fracciones SEC hidrolizadas (Figura 5A) son similares a los espectros de las fracciones SEC no hidrolizadas (Figura 3), pero hubo desplazamientos y cambios de intensidad en algunas bandas debido a las interacciones entre los componentes después de la proteólisis. En la Figura 5B se amplió la región de 800 a 1,200 cm^{-1} para mayor claridad. La señal a 1,154 cm^{-1} en las fracciones SEC (Figura 3B) se desplazó a 1,151 cm^{-1} en F3H y F4H y casi desapareció en F2H y F1H, indicando cambios en el grado de sustitución de los arabinoxilanos. El

pico de 944 cm^{-1} en las fracciones SEC se desplazó a 954 cm^{-1} en las fracciones SEC hidrolizadas. En F1H a F3H, la banda de $1,065\text{ cm}^{-1}$ observada en las fracciones SEC se dividió en dos señales, en $1,073$ y $1,046\text{ cm}^{-1}$. Las bandas de amida I y amida II se desplazaron un poco, apareciendo a $1,628\text{ cm}^{-1}$ y $1,530\text{ cm}^{-1}$. También se aprecia una mayor intensidad de las señales de proteína en L4H y la aparición de estas en L5H, lo cual se debe a la adición de la proteasa.

Es difícil asignar con precisión todas las señales e interpretar los desplazamientos dentro de la región de 800 a $1,200\text{ cm}^{-1}$ debido a la superposición de bandas (Kačuráková *et al.*, 2000). Igualmente, llama la atención la aparición de una señal en $1,574\text{ cm}^{-1}$ en los espectros IR de los hidrolizados, la cual no se observa en los espectros correspondientes a las fracciones SEC de la Figura 3. Sin embargo, a partir de la información proporcionada por los espectros IR, se puede deducir que durante la proteólisis de las proteínas del WBAE se exponen grupos funcionales previamente no disponibles. Lo anterior da lugar a interacciones espontáneas con la subsecuente formación de estructuras supramoleculares.

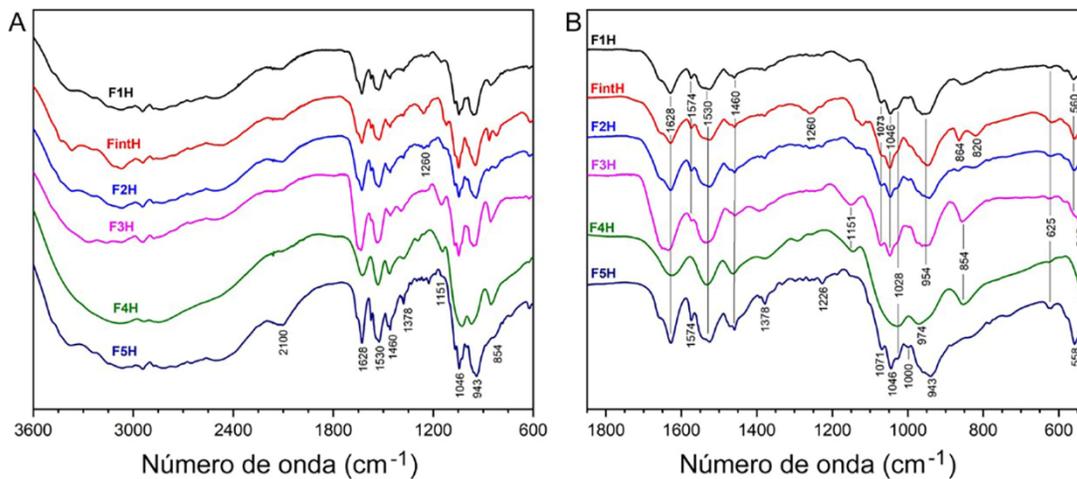


Figura 5. Espectros IR de fracciones SEC de extracto acuoso de salvado de trigo, hidrolizadas por proteasa V8 en presencia de Ca^{2+} (A). Ampliación de la región $800 - 1200\text{ cm}^{-1}$ de los mismos espectros IR (B).

Fuente: Elaboración propia, con base en los resultados del presente trabajo.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes SEM de los hidrolizados correspondientes a cada fracción SEC y sus respectivos controles (recuadros) se muestran en la Figura 6. No se observan estructuras bien definidas en F1H o FintH, excepto varias estructuras en escala micrométrica. En el Control F1, llama la atención lo que parecen ser esferas inmersas dentro de una matriz, de aproximadamente 2 μm de diámetro. En el Control Fint se muestran estructuras esféricas similares, de 200 nm de diámetro, muchas de las cuales se unen para formar una red tridimensional porosa. Se han reportado estructuras similares a las del Control F1 y Control Fint, las cuales son inducidas por la aplicación de calor, sin intervención de proteasas o calcio (Luna-Valdez *et al.*, 2019).

El Control F3 tiene una superficie lisa, con pequeñas incrustaciones y algunos aglomerados, mientras que en el hidrolizado F3H se observan estructuras aparentemente esféricas dentro del rango nanométrico, aglomeradas y mantenidas juntas por lo que parece ser un pegamento. A mayor magnificación, estas estructuras no parecen ser esferas individuales, sino que forman un continuo con el pegamento (imagen no mostrada). En el Control F2, se observan nuevamente estructuras como las del Control Fint y se intuye que su formación se induce por el calor administrado durante la inactivación de la proteasa V8. Por otro lado, en el hidrolizado F2H están presentes unas estructuras esféricas bien definidas, de aprox. 200 nm de diámetro, donde la matriz desapareció por completo por la acción del ultrasonido en el paso previo al análisis SEM, revelando así las esferas individuales. Estas esferas se fusionan entre sí de forma longitudinal (indicado por las flechas en la Figura 6), formando líneas o fibras que se asemejan a las imágenes SEM reportadas por Chaquilla-Quilca *et al.* (2016). La fusión o elongación de micelas peptídicas esféricas ha sido reportada por otros autores (Khoe *et al.*, 2009). En los hidrolizados F4H y F5H, solo se observaron partículas con una distribución de tamaños polidispersa y sin forma definida (imágenes no mostradas), lo cual indica que las proteínas desempeñan un papel importante en la formación de las nanoesferas. En el hidrolizado F2H de la Figura 6 también se observan esferas unidas a una estructura central en crecimiento, en diferentes ángulos, lo que podría dar lugar a sitios de ramificación.

En un estudio previo, reportado por Chaquilla-Quilca *et al.* (2016), se encontraron estructuras tubulares bifurcadas con 200 nm de diámetro externo. Para explicar el mecanismo de formación se propuso que, posterior a la proteólisis, se forman láminas largas, consistentes en proteínas y arabinosilanos, las cuales se enrollan para así formar nanotubos. En su lugar, el conjunto de resultados del presente trabajo indica que la creación de nanoestructuras complejas inicia con la formación de nanoesferas y que la fracción cromatográfica F2 del extracto acuoso de salvado de trigo, contiene los componentes necesarios para ello. La fracción F2 se distingue del resto de las fracciones por un mayor contenido de proteínas y un alto contenido de compuestos fenólicos, seguramente ácido ferúlico esterificado a arabinosilanos, como se discutió anteriormente. Puesto que estos tres componentes se encuentran formando grandes complejos moleculares, se propone la siguiente secuencia de eventos para explicar el mecanismo de formación de las nanoesferas. En este modelo, una estructura primaria particular de las proteínas contenidas en la fracción F2 debe reconocerse como algo fundamental. En un primer paso, la proteasa V8 escinde en los residuos Asp y Glu de las proteínas, lo que desestabiliza los grandes complejos moleculares al

tiempo que se expone un gran número de grupos carboxilo con carga negativa. Las proteínas así hidrolizadas se reducen en tamaño y, por lo tanto, también los complejos moleculares de los que forman parte. En un segundo paso, los nuevos complejos, más pequeños y considerados como los bloques de construcción moleculares, se auto ensamblan a través de múltiples uniones mediadas por los iones Ca^{2+} presentes en el medio. Esto último da lugar a estructuras nanométricas que adoptan una forma esférica debido a que es la que ofrece una mayor estabilidad termodinámica. Finalmente, mediante otro tipo de interacciones, las esferas se unen entre sí en diferentes ángulos; estas interacciones podrían darse a través de puentes entre iones Ca^{2+} y fitatos, los que posiblemente estén presentes en los extractos de salvado. En el modelo, los arabinosilanos quedarían expuestos en la superficie formando un continuo con el conjunto de estructuras esféricas, para después desprenderse por acción del ultrasonido. Si las nanoesferas resultasen ser huecas, se explicaría la formación de las estructuras tubulares reportadas por Chaquilla-Quilca *et al.* (2016) ya que estas y las nanoesferas tienen el mismo diámetro. Actualmente se trabaja en estos aspectos para dilucidar con más precisión la composición y estructura de las nanopartículas, así como el mecanismo de su formación.

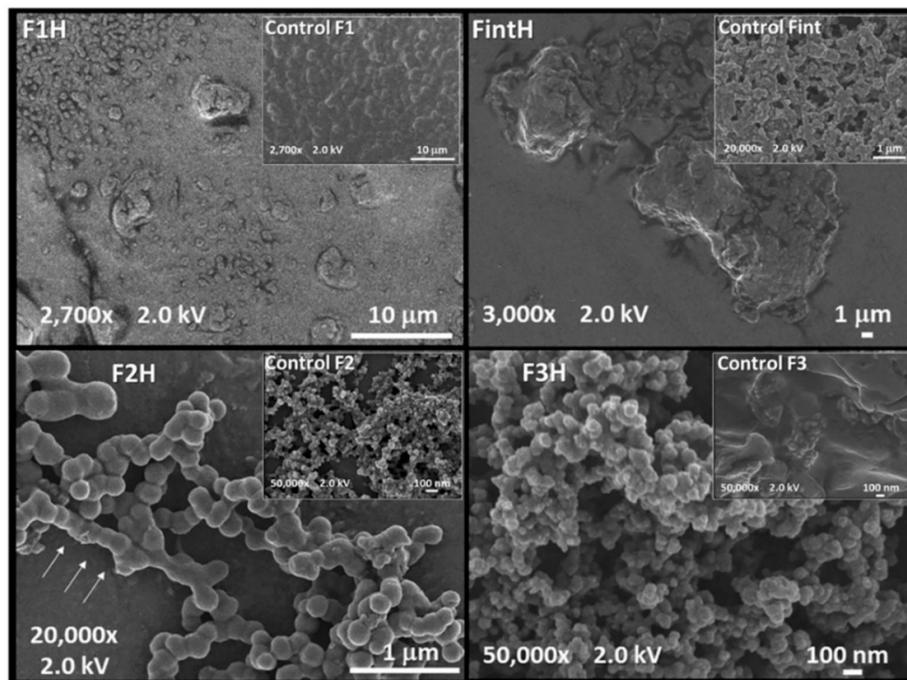


Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de fracciones SEC sometidas a proteólisis por V8 en un medio de reacción conteniendo Ca^{2+} .

Los recuadros corresponden a las muestras control. El sufijo H indica que la fracción SEC se hidrolizó.

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados del presente trabajo.

Conclusiones

En una fracción única del extracto acuoso de salvado de trigo, que contiene complejos de arabinosilanos-proteína-ácido ferúlico con masas moleculares entre 18 y 25 kDa estimadas por SDS-PAGE, ocurre la formación de nanopartículas mediante hidrólisis con la proteasa V8 en presencia de Ca^{2+} . Las nanopartículas resultantes son nanoesferas de 200 nm de diámetro, fusionadas en dirección longitudinal y en diferentes ángulos, lo que proporciona sitios de unión para ramificaciones. En conjunto, la información obtenida en este trabajo es importante para entender mejor el autoensamblaje molecular de las nanopartículas proteicas ya que pone en perspectiva el estudio de interacciones moleculares inesperadas que pueden dar lugar a nanoestructuras con aplicaciones innovadoras.

Contribuciones de los autores

GChQ: Análisis formal, Investigación, Redacción-Preparación del borrador original. **RRBQ:** Conceptualización, Metodología, Supervisión, Recursos, Administración de proyectos, Captación de financiamiento. **JAAB:** Recursos, Investigación, Redacción-Revisión y Edición. **GRCM:** Recursos, Redacción-Revisión y Edición. **AMMW:** Recursos, Redacción-Revisión y Edición. **YLLF:** Redacción-Revisión y Edición. **JGLV:** Análisis formal, Investigación. **JAHO:** Metodología, Análisis formal.

Financiamiento

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), México, mediante los proyectos A1-S-40197 y CB/2011-169839. Los análisis SEM y FTIR se realizaron en el Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales, Cinvestav-IPN-Mérida, financiado por los proyectos FOMIX-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 y 204822.

Agradecimientos

Gracias a la Dra. Patricia Quintana Owen, por permitir el acceso a LANNBIO; a Dora Huerta Quintanilla, por el soporte técnico en el análisis SEM; a Karla Martínez Robinson y Rosa Armenta Corral, de CIAD, A.C., por el apoyo analítico. Un agradecimiento especial a la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, Perú, por el apoyo brindado a Guadalupe Chaquilla-Quilca.

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Referencias

- Adams, E.L., Kroon, P.A., Williamson, G., & Morris, V.J. (2003). Characterization of heterogeneous arabinoxylans by direct imaging of individual molecules by atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*, 338(8), 771–780. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00017-X)
- Aitken, A., Learmonth, M.P. (2002). Protein determination by UV absorption. In Walker J.M. (Ed.). *The protein protocols handbook*, 2nd ed. (pp. 3-6). Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Álvarez-Castillo, E., Félix, M., Bengoechea, C., & Guerrero, A. (2021). Proteins from agri-food industrial biowastes or co-products and their applications as green materials. *Foods*, 10(5), 981. <https://doi.org/10.3390/foods10050981>
- Antoine, C., Peyron, S., Mabilille, F., Lapiere, C., Bouchet, B., Abecassis, J., & Rouau, X. (2003). Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(7), 2026-2033. <https://doi.org/10.1021/jf0261598>
- AOAC (2005). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. 18th Ed. Washington, USA.
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1767(9), 1073-1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Barron, C., & Rouau, X. (2008). FTIR and Raman signatures of wheat grain peripheral tissues. *Cereal Chemistry*, 85(5), 619-625. <https://doi.org/10.1094/CCHEM-85-5-0619>
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Călinoiu L.F., & Vodnar, D.C. (2019). Thermal processing for the release of phenolic compounds from wheat and oat bran. *Biomolecules*, 10(1):21. <https://doi.org/10.3390/biom10010021>
- Cipriani, T.R., Mellinger, C.G., Bertolini, M.L.C., Baggio, C.H., Freitas, C.S., Marques, M.C.A., Gorin, P.A.J., Sasaki, G.L., & Iacomini, M. (2009). Gastroprotective effect of a Type I arabinogalactan from soybean meal. *Food Chemistry*, 115(2), 687-690. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.017>
- Chaquilla-Quilca, G., Baladrán-Quintana, R.R., Azamar-Barrios, J.A., Ramos-Clamont Montfort, G., Mendoza-Wilson, A.M., Mercado-Ruiz, J.N., Madera-Santana T.J., López-Franco, Y.L., & Luna-Valdez, J.G. (2016). Synthesis of tubular nanostructures from wheat bran albumins during proteolysis with V8 protease in the presence of calcium ions. *Food Chemistry*, 200, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.005>
- De Brier, N., Gomand, S.V., Celus, I., Courtin, C.M., Brijs, K., & Delcour J.A. (2015). Extractability and chromatographic characterization of wheat (*Triticum aestivum* L.) bran protein. *Journal of Food Science*, 80(5), C967-C974. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12856>
- Drapeau, G.R., Boily, Y., & Houmard, J. (1972). Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 247(20), 6720-6726. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)44749-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)44749-2)
- Fincher, G.B., Stone, B.A., & Clark, A.E. (1983). Arabinogalactan-proteins: Structure, biosynthesis, and function. *Annual Reviews of Plant Physiology*, 34, 47-70. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.34.060183.000403>

- Graveland-Bikker, J. F., Ipsen, R., Otte, J., & De Kruif, C. G. (2004). Influence of calcium on the self-assembly of partially hydrolyzed α -lactalbumin. *Langmuir*, 20(16), 6841–6846. <https://doi.org/10.1021/la049579v>
- Hollmann, J., Elbegaya, N., Pawelzik, E., & Lindhauer, M.G. (2009). Isolation and characterization of glucuronoarabinoylans from wheat bran obtained by classical and ultrasound-assisted extraction methods. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods* (pp. 231-239) Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1757-837X.2009.00039.x>
- Hromádková, Z., Paulsen, B.S., Polovkac, M., Köstálová, Z., & Ebringerová, A. (2013). Structural features of two heteroxylan polysaccharide fractions from wheat bran with anti-complementary and antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, 93(1), 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.021>
- Izydorczyk, M., Biliaderis, C.G., & Bushuk, W. (1991). Comparison of the structure and composition of water-soluble pentosans from different wheat varieties. *Cereal Chemistry*, 68:139-144.
- Kačuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N., & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: Pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, 43(2), 195-203. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00151-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00151-X)
- Kačuráková, M., & Wilson, R.H. (2001). Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. *Carbohydrate Polymers*, 44(4), 291-303. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00245-9)
- Khan, K., & Shewry, P.R. (2009). *Wheat chemistry and technology*, 4th Ed. (pp. 480). AACC International Inc., St. Paul, MN.
- Khoe, U., Yang, Y., & Zhang, S. (2009). Self-Assembly of nanodonor structure from a cone-shaped designer lipid-like peptide surfactant. *Langmuir*, 25(7), 4111-4114. <https://doi.org/10.1021/la8025232>
- Kianfar E. (2021). Protein nanoparticles in drug delivery: Animal protein, plant proteins, and protein cages, albumin nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*. 19(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00896-3>
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Li, T., Lu, X-M., Zhang, M-R., Hu, K., & Li, Z. (2022). Peptide-based nanomaterials: Self-assembly, properties and applications. *Bioactive Materials*, 11, 268-282. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.029>
- Liu, Q., Sun, Y., Cheng, J., & Guo, M. (2022). Development of whey protein nanoparticles as carriers to deliver soy isoflavones. *LWT—Food Science and Technology*, 155, 112953. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112953>
- Loosvel, A.M., Piet, J. Grobet, P., & Delcour, J.A. 1997. Contents and structural features of water-extractable arabinogalactan in wheat flour fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6):1998-2002. <https://doi.org/10.1021/jf960901k>
- Luna-Valdez, J.G., Balandrán-Quintana, R.R., Azamar-Barrios, J.A., Ramos Clamont-Montfort, G., Mendoza-Wilson, A.M., Mercado-Ruiz, J.N., Madera-Santana, T.J., Rascon-Chu, A., & Chaquilla-Quilca, G. (2017). Structural and physicochemical characterization of nanoparticles synthesized from an aqueous extract of wheat bran by a cold-set gelation/desolvation approach. *Food Hydrocolloids*, 62, 165-173. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.034>
- Luna-Valdez, J.G., Balandrán-Quintana, R.R., Azamar-Barrios, J.A., Ramos Clamont-Montfort,

- G., Mendoza-Wilson, A.M, Madera-Santana, T.J., Rascón-Chu, A., & Chaquilla-Quilca, G. (2019). Assembly of biopolymer particles after thermal conditioning of wheat bran proteins contained in a 21–43 kDa size exclusion chromatography fraction. *Food Hydrocolloids*, 94, 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.003>
- Maes, C., & Delcour, J.A. (2002). Structural characterization of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 315-326. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0439>
- Mandal, D., Shirazi, A.N., & Parang, K. (2014). Self-assembly of peptides to nanostructures. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 12, 3544-3561. <https://doi.org/10.1039/C4OB00447G>
- Marschessault, R.H., & Liang, C.Y. (1962). The infrared spectra of crystalline polysaccharides. VIII. Xylans. *Journal of Polymer Science*, 59(168), 357-378. <https://doi.org/10.1002/pol.1962.1205916813>
- Morales-Ortega, A., Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Gardea-Béjar, A., Torres-Chávez, P., López-Franco, Y., Rascón-Chu, A., & Lizardi-Mendoza, J. (2013). Los arabinoxilanos ferulados de cereales: Una revisión de sus características fisicoquímicas y capacidad gelificante. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(4), 439-446.
- Obel, A.E., Porchia, A.C., & Scheller, H.V. (2003). Intracellular feruloylation of arabinoxylan in wheat: Evidence for feruloyl-glucose as precursor. *Planta*, 216, 620–629. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0863-9>
- Peng, H., Gan, Z., Xiong, H., Luo, M., Yu, N., Wen, T., Wang, R., & Li, Y. (2017). Self-assembly of protein nanoparticles from rice bran waste and their use as delivery system for curcumin. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(8), 6605–6614. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00851>
- Ren, Z., Chen, Z., Zhang, Y., Lin, X., & Li, B. (2020). Characteristics and rheological behavior of Pickering emulsions stabilized by tea water-insoluble protein nanoparticles via high-pressure homogenization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 151(15), 247 – 256. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.090>
- Robert, P., Marquis, M., Barron, C., Guillon, F., & Saulnier, L. (2005). FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7014-7018. <https://doi.org/10.1021/jf051145y>
- Saeed, F., Pasha, I., Anjum, F.M., & Sultan M.T. (2011). Arabinoxylans and arabinogalactans: a comprehensive treatise. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 467-476. <https://doi.org/10.1080/10408391003681418>
- Saleh, S.M., Ahmed, F.A., Ahmed, O.K., & Radwan, M.S. (2020). Preparation, characterization, and properties of protein nanoparticles from feather waste. *Egyptian Journal of Chemistry*, 63(3), 993-999. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2019.13534.1855>
- Saulnier, L. & Thibault, J.F. (1999). Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(3), 396-402. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3%3C396::AID-JSFA262%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3%3C396::AID-JSFA262%3E3.0.CO;2-B)
- Séné, C.F.B., McCann, M.C., Wilson, R.H., & Crinter, R. (1994). Fourier-transform Raman and Fourier-transform infrared spectroscopy: An investigation of five higher plant cell walls and their components. *Plant Physiology*, 106(4), 1623-1631. <https://doi.org/10.1104/pp.106.4.1623>

- Shen, P., Zhou, F., Zhang, Y., Yuan, D., Zhao, Q., & Zhao, M. (2020). Formation and characterization of soy protein nanoparticles by controlled partial enzymatic hydrolysis. *Food Hydrocolloids*, 105, 105844. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105844>
- Stafstrom J.P. & Staehelin, A. (1986). The role of carbohydrate in maintaining extensin in an extended conformation. *Plant Physiology*, 81(1), 242-246. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.81.1.242>
- Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. (pp. 221). John Wiley & Sons, Ltd.
- Tapia-Hernández, J.A., Del-Toro-Sánchez, C.L., Cinco-Moroyoqui, F.J., Juárez-Onofre, J.E., Ruiz-Cruz, S., Carvajal-Millan, E., López-Ahumada, G.A., Castro-Enriquez, D.D., Barreras-Urbina, C.G., & Rodríguez-Felix, F. (2019). Prolamins from cereal by-products: Classification, extraction, characterization, and its applications in micro- and nanofabrication. *Trends in Food Science and Technology*, 90, 111–132. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.005>
- Xu, B., & Chang, S. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72(2), S159-S166. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x>
- Yuan, D., Zhou, F., Niu, Z., Shen, P., & Zhao, M. (2023). Formation of mucus-permeable nanoparticles from soy protein isolate by partial enzymatic hydrolysis coupled with thermal and pH-shifting treatment. *Food Chemistry*, 398, 133851. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133851>
- Zhang, T., Li, L., Chunta, S., Wu, W., Chen, Z., & Lu, Y. (2023). Enhanced oral bioavailability from food protein nanoparticles: A mini review. *Journal of Controlled Release*, 35, 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.12.043>