

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Casa abierta al tiempo

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CLOROGENATO HIDROLASA DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADAS DE LA PULPA DE CAFÉ”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

I.B.I CLAUDIA KARINA PACHECO MARTÍNEZ

Director: Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda,

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Depto. Biotecnología.

Asesores:

Dr. Luis Víctor Rodríguez Durán,

Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas.

Dr. Sergio Huerta Ochoa,

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Depto. De Biotecnología

Ciudad de México

octubre 2020

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana en la Unidad Iztapalapa está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACyT con referencia 001466. Claudia Karina Pacheco Martínez agradece el apoyo de CONACyT por la beca recibida para obtener este grado (CVU 868662, con una mención al proyecto CONACyT ciencias básicas FONCICYT 273656, de la convocatoria 2015 ANR-CONACYT “Use of lactic acid bacteria for the control of level of ochratoxin A (OTA) in coffee beans” acrónimo ANGELICA). Proyecto ciencias básicas A1-S-29456

Agradecimientos

A mis padres y abuelitos por su inmenso apoyo, su amor, sus consejos su guía y comprensión que me ayudaron a llegar hasta este punto.

A mi hijo por todo su amor, este logro es de los dos.

Al Dr. Gerardo Saucedo por sus enseñanzas, su amistad, su tiempo, su comprensión, sus correcciones, sus consejos, por dirigir mi tesis y ayudarme a culminar este proyecto.

Al Dr. Sergio Huerta y al Dr. Luis V. Rodríguez por sus recomendaciones, sus correcciones, su amistad, sus consejos, por ayudarme a la culminación de este proyecto.

A la directora de posgrado Dra. Gabriela Rodríguez por su apoyo.

A todos los doctores, amigos y compañeros de trabajo de la planta piloto 4.

A mis amigos que siempre me apoyaron y ayudaron, Gloria D, Jesica R, Gregorio, Maria Eugenia, Isabel C, Jesica H, Yareth H, León.E, Zagnigte, Carolina.

Con una mención al proyecto CONACyT ciencias básicas FONCICYT 273656, de la convocatoria 2015 ANR-CONACYT “Use of lactic acid bacteria for the control of level of ochratoxin A (OTA) in coffee beans” acrónimo ANGELICA

Ciudad de México 10 Noviembre de 2020

El jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CLOROGENATO HIDROLASA DE CEPAS DE
HONGOS FILAMENTOSOS AISLADAS DE LA PULPA DE CAFÉ**

que presentó

Claudia Karina Pacheco Martínez

Director Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Asesores Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa
Dr. Luis Victor Rodríguez Duran
Universidad Autónoma de Tamaulipas

JURADO

Presidente Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Secretario Dr. Luis Víctor Rodríguez Duran
Universidad Autónoma de Tamaulipas

Vocal Dra. Elena Isabel Champion Martínez
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Vocal M en B María Eugenia Aguilar Álvarez
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

RESUMEN

La cafecultura en México es de gran relevancia social, económica y ambiental, durante el 2018 las zonas cafetaleras abarcaron 712 mil hectáreas. México es el onceavo productor mundial de café. Esta producción genera desechos como la pulpa de café (PC), se estima que se generan más de medio millón de toneladas de este subproducto al año, lo que representa un gran problema de contaminación si la PC no es tratada en forma adecuada.

Por lo mencionado anteriormente en esta tesis se plantea la utilización de la PC para la producción de metabolitos con actividad biológica, así como la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa a partir de hongos filamentosos del género *Aspergillus*, y la caracterización enzimática, a través de las constantes cinéticas K_m y V_{max} .

Durante la primera etapa experimental se evaluó la posible actividad clorogenato hidrolasa para *Aspergillus niger* (*A. niger*) CBA16-6 y *Aspergillus niger* (*A. niger*) CBR 16-4, usando extracto de café verde como fuente de ácido clorogénico (ACL) y como única fuente de carbono, se determinó que tenían la capacidad de hidrolizar el ACL y crecer, se midieron los halos de hidrólisis encontrando valores de 1.15 para *A. niger* CBA16-6 y 1.19 para *A. niger* CBR 16-4.

En la siguiente fase experimental se observó que la cepa *A. niger* CBR 16-4 presenta la mayor velocidad de crecimiento radial con un valor de 0.049 cm/h. Posteriormente se hizo una caracterización morfológica de las cepas fúngicas seleccionadas. Se determinó la relación longitud/diámetro (L/D) de la hifa y se comprobó que las dos cepas tenían relaciones L/D grandes con valores de 10.05 para *A. niger* CBA 16-6 y 9.29 para *A. niger* CBR16-4.

En la caracterización de la PC con extractos metanólicos se encontró una mayor concentración de ACL de 2-4 mg /g materia seca (MS) y en la hidrólisis alcalina se encontró una concentración de ACL de 0.95-1.04 mg /g MS seguida de una concentración de ácido cafeico (AC) de 0.62-0.65 mg /g MS. Las dos cepas seleccionadas se cultivaron en medio sólido se encontró que en la PC adicionada de glucosa para ambas cepas se alcanzaron tasas de producción de CO₂ altas 3.1-5.5 mg CO₂/h g MS después de 40 h de cultivo aproximadamente.

Durante la siguiente etapa experimental se produjo extracto enzimático usando agrolita como soporte y un medio de cultivo definido como sustrato con extracto de café verde con ACL como única fuente de carbono, encontrando una reducción de la tasa de producción de CO₂ de 2.7 a 2.9 mg CO₂/ h g MS a tiempos de fermentación de cultivo más cortos 11 a 16 h respectivamente. Los extractos enzimáticos se analizaron por HPLC encontrando que el ACL disminuye a lo largo de la fermentación hasta las 36 horas a este tiempo deja de disminuir para mantenerse constante. Por su parte el AC aumenta al ser hidrolizado para posteriormente disminuir al ser consumido.

En las reacciones enzimáticas se utilizó extracto enzimático producido a 12 y 24 h de cultivo a un tiempo de reacción de 60 min, para las reacciones enzimáticas se prepararon soluciones de ACL con una concentración que va de 1.10×10^{-2} a 28.22 mmol obtenido valores K_m de $1.1 \times 10^{-2} - 1.64$ (mmol) y V_{max} de 0.2-0.75 nkatal/g MS.

ABSTRACT

Coffee farming in México is of great social, economic and environmental relevance, during 2018 the coffee growing areas covered 712 thousand hectares, Mexico is the 11 th largest coffee producer in the. This production generates by products such as coffee pulp (CP). It is estimated that more than half a million tons of this by-product are produced per year, this represents a great contamination problem if the CP is not treated property

Due to the aforementioned in this thesis, the use of CP for the production of metabolites with biological activity as well as the production of enzymes with chlorogenate hydrolase activity, from filamentous fungi of the genus *Aspergillus*, and enzymatic laization, through kinetic constants K_m and V_{max} .

During the first experimental stage, the possible chlorogenate hydrolase activity was evaluated for *A. niger* CBA 16-6 and *A. niger* CBR16-4, using green coffee extract as a source of chlorogenic acid (CGA) and the sole carbon source, selecting strains that have the ability to hydrolyze the CGA and use them as a source. of carbon, hydrolysis halos were measured and found values of 1.15 for *A. niger* CBA16-6 and 1.19 for *A. niger* CBR 16-4.

The *A. niger* CBR 16-4 strain has the highest radial growth rate with a value of 0.049 cm/h. Subsequently, a morphological characterization of the selected fungal strains was made. Their length / diameter (L/D) ratio of the hypha was determined and it was verified that the two strains have large L/D ratios with values of 10.05 for *A. niger* CBA 16-6 and 9.29 for *A. niger* CBR16-4.

In the characterization of the CP, a higher concentration of CGA of 2-4 mg / g of dry matter (DM) is found in methanolic extraction, and in the alkaline hydrolysis, a CGA

concentration of 0.95-1.04 mg / g of DM is found, along with a caffeic acid (CA) concentration of (0.62-0.65 mg / g DM). The two selected strains were grown in solid medium and were found that in the CP with added glucose, high CO₂ production rates (3.1-5.5 mg CO₂ / h g DM) were reached after approximately 40 h of culture for both strains.

During the second stage, an enzymatic extract was found using agrolite as a solid support and a culture medium defined as a substrate with green coffee extract as the only carbon source, finding a reduction in the CO₂ production rate of (2.7-2.9 mg CO₂ / hg MS) at shorter culture fermentation times (11-16 h). The enzymatic extracts were analyzed by HPLC, finding that CGA concentration decreases throughout the fermentation, but remains constant from 36 to 48 h. On the other hand, CA increases as a result the CGA hydrolysis and subsequently decrease when consumed.

In the enzymatic reactions, enzymatic extract produced at 12 and 24 h of culture were found at a reaction time of 60 min, the concentration of CGA was varied from 1.10×10^{-2} to 28.22 mmol obtained K_m values of 1.1×10^{-2} - 1.64 mmol and V_{max} 0.2-0.75 nkatal/g MS.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| 1.- INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 PULPA DE CAFÉ | 3 |
| 2.1.2 USOS DE LA PULPA DE CAFÉ | 3 |
| 2.1.3. COMPOSICIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ..... | 5 |
| 2.1.4 COMPUESTOS FENÓLICOS | 6 |
| 2.1.5 COMPUESTOS HIDROXICINÁMICOS | 8 |
| 2.1.6 ÁCIDO CLOROGÉNICO | 9 |
| 2.2 ENZIMAS CAPACES DE HIDROLIZAR ÁCIDO CLOROGÉNICO | 11 |
| 2.2.1 CLOROGENATO HIDROLASAS..... | 11 |
| 2.2.2. FERULOIL ESTERASAS | 13 |
| 2.3 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO..... | 14 |
| 2.4 PARÁMETROS CINÉTICOS DE MICHAELIS- MENTEN K_m Y V_{max}..... | 15 |
| 2.4.1 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS A TRAVÉS DE MODELOS DE REGRESIÓN LINEAL..... | 17 |
| 3.- ANTECEDENTES DIRECTOS EN EL LABORATORIO | 19 |
| 4.-JUSTIFICACIÓN..... | 23 |
| 5.- HIPÓTESIS..... | 23 |
| 6.- OBJETIVOS..... | 24 |
| 6.1 OBJETIVO GENERAL | 24 |
| 6.2 OBJETIVOS PARTICULARES..... | 24 |
| 7.- MATERIALES Y METODOS..... | 25 |
| 7.1 ORIGEN DE CEPAS..... | 25 |
| 7.2 PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS..... | 25 |
| 7.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS FÚNGICAS..... | 26 |
| 7.4 SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS QUE PRODUCEN CLOROGENATO HIDROLASA | 27 |
| 7.5 CARACTERIZACIÓN DE PULPA DE CAFÉ..... | 28 |
| 7.5.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS | 28 |
| 7.5.1.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS SOLUBLES | 28 |
| 7.5.1.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS INSOLUBLES | 29 |
| 7.6 CUANTIFICACIÓN DE AHs POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)..... | 29 |
| 7.7 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO PRODUCCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 7.7.1 SOPORTE SÓLIDO PULPA DE CAFÉ..... | 30 |
| 7.7.2 SOPORTE SÓLIDO AGROLITA..... | 30 |
| 7.8 EXTRACTO EZIMATICO | 31 |
| 7.9 REACCIÓN ENZIMÁTICA..... | 31 |
| 7.9.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 32 |
| 8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 32 |
| 8.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS FÚNGICAS..... | 32 |
| 8.2 SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS CON ACTIVIDAD CLOROGENATO HIDROLASA (CH)..... | 37 |
| 8.3 CARACTERIZACIÓN DE UNA FUENTE ALTERNATIVA DE ÁCIDO CLOROGÉNICO | 43 |
| 8.4 CARACTERIZACIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ..... | 44 |
| 8.4.1 EXTRACCION DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS SOLUBLES E INSOLUBLES | 44 |
| 8.4.1.1 PULPA DE CAFÉ CHIAPAS..... | 44 |
| 8.4.1.2 PULPA DE CAFÉ PP4 | 45 |
| 8.5 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO..... | 46 |
| 8.5.1 PULPA DE CAFÉ | 46 |
| 8.5.2 CULTIVOS USANDO AGROLITA COMO SOPORTE | 51 |
| 8.6 EXTRACTOS ENZIMÁTICOS..... | 55 |
| 8.7 REACCIÓN ENZIMÁTICA..... | 57 |
| 9.- CONCLUSIONES GENERALES..... | 66 |
| 9.1 PERSPECTIVAS..... | 68 |
| 10.- REFERENCIAS | 68 |
| 11.- ANEXOS | 77 |
| 11.1 ANEXO 1. Preparación de inóculo | 77 |
| 11.2 ANEXO 2. Composición de azul de lactofenol | 77 |
| 11.3 ANEXO 3 Longitud y diámetro de hifas | 78 |
| 11.4 ANEXO 4 Crecimiento radial de cepas fúngicas | 86 |
| 11.5 ANEXO 5 Hidrólisis de ácido clorogénico..... | 87 |
| 11.6 ANEXO 6 Actividad enzimática | 88 |
| 11.7 ANEXO 7 Modelos de regresión lineal | 89 |
| 11.8 ANEXO 8 Memoria de calculo..... | 92 |

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------|--|
| ACL: | Ácido Clorogénico |
| AF: | Ácido Ferúlico |
| AC: | Ácido Cafeico |
| AHs: | Ácidos Hidroxicinámicos |
| AQ: | Ácido Quínico |
| <i>Ap-C</i> : | Ácido <i>para</i> - Cumárico |
| FE: | Feruloil esterasas |
| CE: | Clorogenato esterasas |
| CH | Clorogenato hidrolasa |
| PC: | Pulpa de café. |
| BS: | Base seca |
| MS: | Materia seca |
| HPLC: | Cromatografía líquida de alta resolución |
| K_m : | Constante de Michaelis |
| V_{max} : | Velocidad máxima |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 Esquema de fenol | 7 |
| Figura 2.2 Principales ácidos hidroxicinámicos (Ardensen y Markham, 2016) | 8 |
| Figura 2.3 Representación de la vía de transformación de los principales ácidos hidroxicinámicos (Torres-Mancera, 2013) | 9 |
| Figura 2.4 Ácido clorogénico (éster de los ácidos quínico y cafeico) x/(Torres-Mancera, 2013) | 10 |
| Figura 2.5 Hidrólisis enzimática de ácido clorogénico, para su disociación en ácido cafeico y ácido quínico (Rodríguez-Duran, 2016) | 11 |
| Figura 2.6 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima (Ancheyta-Jorge, 2017) | 17 |
| Figura 8.1 A) <i>A. niger</i> a) microconidios; b) fiálides; c) vesículas; d) Conidióforo. B) <i>A. japonicus</i> AN5, 72 h de incubación | 33 |
| Figura 8.2) Estructuras de las hifas <i>A. niger</i> CHI a 72 h de cultivo. | 33 |
| Figura 8.3 Datos originales de longitud y diámetro de las hifas de <i>A. niger</i> CBA16-6 A) longitud y B) diámetro, cepa que presento una mayor relación L/D. | 34 |
| Figura 8.4 Mediciones de las hifas de <i>A. niger</i> CBA16-6 A) longitud y B) diámetro, (outlier 10%) Cepa con mayor relación L/D. | 34 |
| Figura 8.5 Datos originales de longitud diámetro de las hifas de <i>A. tamaritii</i> VI2307 A) longitud y B) diámetro, cepa con menor relación L/D. | 35 |
| Figura 8.6 Medición de las hifas de <i>A. tamaritii</i> VI2307 A) longitud y B) diámetro. (outlier de 10 %) cepa con menor relación L/D | 35 |
| Figura 8.7 <i>B. bassiana</i> (control negativo), crecimiento radial a 3 días de incubación a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h. | 38 |
| Figura 8.8 <i>A. tamaritii</i> VI2307, crecimiento radial a 3 días de incubación a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h. | 39 |
| Figura 8.9 <i>A. niger</i> CBA 16-6, crecimiento radial a 3 días de incubación a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h. | 39 |
| Figura 8.10 <i>A. niger</i> CBR 16-4 crecimiento radial a 3 días de incubación, a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h. | 40 |
| Figura 8.11 Índice de potencia para cada cepa evaluada | 41 |
| Figura 8.12 Crecimiento radial de cepas fúngicas (<i>A. niger</i> CBR16-4) | 42 |
| Figura 8.13 A) Tasa de producción de CO_2 en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Tasa de producción de CO_2 en pulpa de café sin glucosa, para <i>A. niger</i> CBA 16-6. | 47 |
| Figura 8.14 A) Tasa de producción de CO_2 en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Tasa de producción de CO_2 en pulpa de café sin glucosa para <i>A. niger</i> CBR16-4. | 48 |
| Figura 8.15 A) Producción de CO_2 en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Producción de CO_2 en pulpa de café sin glucosa para <i>A. niger</i> CBA 16-6 | 49 |

| | |
|--|----|
| Figura 8.16 A) Producción de CO ₂ en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Producción de CO ₂ en pulpa de café sin glucosa para <i>A. niger</i> CBR16-4 | 49 |
| Figura 8.17 A) Tasa de producción de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBA 16-6, B) Tasa de producción de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBR16-4 | 52 |
| Figura 8.18 A) Producción acumulada de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBA 16-6, B) Producción acumulada de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBR 16-4 | 52 |
| Figura 8.19 A) Tasa de producción de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBA 16-6, B) Tasa de producción de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBR 16-4 | 54 |
| Figura 8.20 A) Producción acumulada de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBA 16-6, B) Producción acumulada de CO ₂ para <i>A. niger</i> CBR 16-4 | 54 |
| Figura 8.21 A) Concentración de ácido clorogénico, B) Concentración de ácido cafeico para <i>A. niger</i> CBA 16-6. | 56 |
| Figura 8.22 A) Concentración de ácido clorogénico, B) Concentración de ácido cafeico para <i>A. niger</i> CBR 16-4 | 57 |
| Figura 8.23 Formación de ácido cafeico para <i>A. niger</i> CBA 16-6 | 58 |
| Figura 8.24 Formación de ácido cafeico para <i>A. niger</i> CBR 16-4 | 59 |
| Figura 8.25 A) Hidrólisis de ácido clorogénico, B) formación de ácido cafeico para <i>A. niger</i> CBA 16-6 | 60 |
| Figura 8.26 A) Hidrólisis de ácido clorogénico, B) formación de ácido cafeico para <i>A. niger</i> CBR 16-4. | 61 |
| Figura 8.27 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en <i>A. niger</i> CBR 16-6 | 62 |
| Figura 8.28 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en <i>A. niger</i> CBR 16-4. | 62 |
| Figura 8.29 Modelos de regresión lineal para la estimación de parámetros cinéticos Km y Vmax | 63 |
| Figura 11.1 Datos de diámetro de las hifas de <i>A. japonicus</i> AN5 A) Datos originales, B) Datos corregidos | 78 |
| Figura 11.2 Datos de longitud de las hifas de <i>A. japonicus</i> AN5 A) Datos originales, B) Datos corregidos. | 78 |
| Figura 11.3 Datos de longitud de las hifas de <i>A. tamarii</i> V12307 A) Datos originales, B) Datos corregidos | 79 |
| Figura 11.4 Datos de diámetro de la hifa de <i>A. tamarii</i> V12307 A) Datos originales, B) Datos corregidos | 79 |
| Figura 11.5 Datos de longitud de la hifa de <i>A. oryzae</i> 2094, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 80 |
| Figura 11.6 Datos de diámetro de la hifa de <i>A. oryzae</i> 2094, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 80 |
| Figura 11.7 Datos de longitud de la hifa de <i>A. niger</i> HT4, A) Datos originales, B) Datos corregidos. | 81 |
| Figura 11.8 Datos de diámetro de la hifa de <i>A. niger</i> HT4, A) Datos originales, B) Datos corregidos. | 81 |
| Figura 11.9 Datos de longitud de la hifa de <i>A. niger</i> GHI, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 82 |
| Figura 11.10 Datos de diámetro de la hifa de <i>A. niger</i> GHI, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 82 |
| Figura 11.11 Datos de longitud de la hifa de <i>A. niger</i> PSH, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 83 |
| Figura 11.12 Datos de diámetro de la hifa de <i>A. niger</i> PSH, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 83 |
| Figura 11.13 Datos de longitud de la hifa de <i>A. niger</i> CBA 16-6, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 84 |
| Figura 11.14 Datos de diámetro de la hifa de <i>A. niger</i> CBA 16-6, A) Datos originales, B) Datos corregidos | 84 |

| | |
|--|-----|
| <i>Figura 11.15 Datos de longitud de las hifas de A. niger CBR 16-4, A) Datos originales, B) Datos corregidos</i> | 85 |
| <i>Figura 11.16 Datos de diámetro de la hifa de A. niger CBR 16-4, A) Datos originales, B) Datos corregidos</i> | 85 |
| <i>Figura 11.17 Crecimiento radial de cepas fúngicas (A. niger CBA 16-6)</i> | 86 |
| <i>Figura 11.18 Crecimiento radial de cepas fúngicas (A. tamaritii V12307)</i> | 86 |
| <i>Figura 11.19 Hidrólisis de ácido clorogénico en A. niger CBA 16-6</i> | 87 |
| <i>Figura 11.20 Hidrólisis de ácido clorogénico en A. niger CBR 16-4</i> | 87 |
| <i>Figura 11.21 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en A. niger CBA 16-6</i> | 88 |
| <i>Figura 11.22 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en A. niger CBR 16-4</i> | 88 |
| <i>Figura 11.23 Modelos de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido clorogénico con extracto enzimático de 12 y 24 h, para A. niger CBA 16-6.</i> | 89 |
| <i>Figura 11.24 Modelos de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido cafeico con extracto enzimático de 12 y 24 h para A. niger CBA 16-6</i> | 90 |
| <i>Figura 11.25 Modelo de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido clorogénico con extracto enzimático a 12 y 24 h para A. niger CBR 16-4</i> | 91 |
| <i>Figura 11.26 Modelos de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido cafeico con extracto enzimático a 12 y 24 h para A. niger CBR 16-4</i> | 92 |
| <i>Figura 11.27 Índice de potencia para cada cepa evaluada</i> | 95 |
| <i>Figura 11.28 Producción de CO_2 en pulpa de café adicionada con glucosa para A. niger CBA 16-6</i> | 98 |
| <i>Figura 11.29 Concentración de ácido clorogénico para A. niger CBR 16-4</i> | 100 |
| <i>Figura 11.30 Formación de ácido cafeico para A. niger CBA 16-6</i> | 101 |
| <i>Figura 11.31 Análisis de la actividad clorogenato hidrolasa en A. niger CBA 16-4</i> | 103 |
| <i>Figura 11.32 Modelos de regresión lineal para la estimación de parámetros cinéticos K_m y V_{max}</i> | 105 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| <i>Tabla 2.1 Usos tradicionales de la pulpa de café</i> | 4 |
| <i>Tabla 2.2 Usos de compuestos extraídos de la pulpa de café</i> | 5 |
| <i>Tabla 2.3 Composición de la pulpa de café</i> | 6 |
| <i>Tabla 2.4 Clasificación de compuestos fenólicos</i> | 7 |
| <i>Tabla 2.5 Constantes cinéticas de las clorogenato hidrolasas en presencia de ácido clorogénico</i> | 13 |
| <i>Tabla 2.6 Precios en el mercado de ACL, AC y AQ</i> | 14 |
| <i>Tabla 2.7 Modelos de regresión lineal para cinéticas con comportamiento de Michaelis-Menten</i> | 18 |
| <i>Tabla 7.1 Origen de cepas utilizadas</i> | 25 |
| <i>Tabla 8.1 Promedios para cada longitud y diámetro de las 8 cepas de Aspergillus analizadas.</i> | 36 |
| <i>Tabla 8.2 Velocidad de crecimiento radial para las tres cepas de Aspergillus</i> | 42 |
| <i>Tabla 8.3 Concentraciones obtenidas en el análisis de fuente alternativa de ácido clorogénico</i> | 43 |
| <i>Tabla 8.4 Cuantificación de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos en muestras de pulpa de café proveniente del estado de Chiapas</i> | 44 |
| <i>Tabla 8.5 Cuantificación de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos en muestras de pulpa de café proveniente de PP4</i> | 45 |
| <i>Tabla 8.6 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio sólido con pulpa de café</i> | 50 |
| <i>Tabla 8.7 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio sólido con agrolita</i> | 53 |
| <i>Tabla 8.8 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio sólido con agrolita</i> | 55 |
| <i>Tabla 8.9 Parámetros de regresión lineal</i> | 59 |
| <i>Tabla 8.10 Valores de K_m y V_{max} para clorogenato hidrolasa, para A. niger CBA16-6</i> | 64 |
| <i>Tabla 8.11 Valores de K_m y V_{max} para clorogenato hidrolasa, para A. niger CBR16-4</i> | 65 |
| <i>Tabla 11.1 Elaboración de colorante azul de lactofenol</i> | 77 |
| <i>Tabla.11.2 Promedios de longitud y diámetro para las 8 cepas de Aspergillus analizadas, datos originales</i> | 93 |
| <i>Tabla.11.3 Promedios de longitud y diámetro para las 8 cepas de Aspergillus analizados</i> | 94 |
| <i>Tabla 11.4 Crecimiento radial de cepas fúngicas</i> | 96 |
| <i>Tabla 11.5 Cuantificación de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos en muestras de pulpa de café proveniente del estado de Chiapas</i> | 97 |
| <i>Tabla 11.6 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio sólido con pulpa de café</i> | 99 |
| <i>Tabla 11.7 Parámetros de regresión lineal</i> | 103 |
| <i>Tabla 11.8 Modelos de regresión lineal para cinéticas con comportamiento de Michaelis-Menten</i> | 104 |
| <i>Tabla 11.9 Valores de K_m y V_{max} para clorogenato hidrolasa, para A. niger CBA16-4</i> | 106 |

1.- INTRODUCCIÓN

México es un importante productor de café a nivel mundial. La pulpa de café (PC) es un subproducto derivado del beneficio húmedo del café y representa alrededor del 40% del peso fresco del fruto, se estima que la industria cafetalera en México genera más de medio millón de toneladas de PC al año (Rodríguez-Duran, 2016). Se busca que estos residuos sean tratados adecuadamente mediante procesos biotecnológicos para evitar problemas ambientales, como la contaminación de cuerpos de agua lo que disminuye la posibilidad de vida de los ecosistemas, el almacenamiento en época de recolección para luego ser retirados y causar contaminación de suelo y de este modo poder obtener compuestos de alto valor agregado.

El ácido clorogénico (ACL) es el ácido fenólico más abundante en la PC, se encuentra en una proporción de 2.3 a 26 g/kg de PC base seca (BS) (Ramírez-Velazco 2016), y representa entre el 51% y el 81 % de los ácidos hidroxicinámicos (AHs). Los AHs presentes en la PC son, ácido cafeico (AC), ácido quínico (AQ) y ácido ferúlico (AF) (Ramírez-Martínez, 1988; Clifford y Ramírez-Martínez, 1991; Ramírez-Coronel *et al.*, 2004; Rodríguez-Duran, 2016). El ACL presenta actividad antiviral, antimicrobiana, antioxidante y antiinflamatoria, reduce la respuesta temprana de glucosa, es usado como modificador del sabor e inhibidor de la glucosa-6-fosfatasa (Bushman *et al.*, 2002; Solís y Herrera, 2005; Schwab *et al.*, 2001; Torres-Mancera, 2013).

Un enfoque de la utilización de PC es la producción de enzimas tales como pectinasas, celulasas, proteasas, lipasas, tanasas, clorogenato hidrolasa, feruloil esterasas, entre otras.

El objetivo de la tesis es desarrollar estrategias para la extracción y transformación de ACL empleando hongos filamentosos con actividad clorogenato hidrolasa cultivados en medio sólido

para lo cual se utilizaron cepas de *Aspergillus*. Se obtuvo la relación longitud/diámetro de las hifas, se evaluó la actividad clorogenato hidrolasa, se caracterizó la PC cuantificando la concentración de ácidos hidroxicinámicos (AHC's) y ACL. Se realizaron análisis cinéticos de la hidrólisis de ACL en AC y AQ y por último se obtuvieron parámetros cinéticos tales como la constante de Michaelis-Menten y la V_{max} .

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El cultivo de café es la principal actividad económica de más de 4,500 comunidades en 12 Estados de la República Mexicana destacando; Chiapas, Veracruz, Puebla, Oaxaca y Guerrero, en los cuales se concentran más del 90% de la producción nacional, de estas, las variedades arábicas (*Coffea arabica* L.) representan el 97% y las robustas (*Coffea canephora* P.) el 3%, esta última se destina principalmente a la industria del café soluble. Durante el 2018 las zonas cafetaleras abarcaron 712 mil hectáreas. México es el onceavo productor mundial de café. (SIAP, 2019)

2.1 PULPA DE CAFÉ

La PC es un importante residuo rico en azúcares y pectina, que se ha convertido en un serio problema por los grandes volúmenes que se producen, provocando contaminación por su alta demanda bioquímica de oxígeno y su rápida fermentación. Si se deposita sin tratamiento sobre terrenos o es vertida a los ríos, produce malos olores, fauna indeseable y eutroficación. La composición química de la PC varía de acuerdo con distintos factores como la variedad del cultivo, la composición del suelo de cultivo, la etapa de madurez del fruto y las prácticas y tratamientos aplicados (Torres-Mancera, 2013).

2.1.2 USOS DE LA PULPA DE CAFÉ

Los usos más comunes de la PC incluyen su uso como fertilizante, alimento animal o composta, otros usos de la PC son la producción lombricomposta, aminoácidos, cultivo de hongos comestibles, producción de pectin-esterasa y poligalacturonasa, producción de biogás, bio-pesticidas y pro-bióticos (Martínez-Carrera *et al.*, 2000). Por medio de estas aplicaciones se

aprovecha solo una fracción de la PC, por esta razón es necesario buscar alternativas de uso de este subproducto (Murthy, *et al.*, 2012). En la Tabla 2.1 se señalan algunos de los usos tradicionales de la PC.

Tabla 2.1 Usos tradicionales de la pulpa de café

| Producto | Referencias |
|--|---|
| Biogás | Rajkumar Rathinavelu, <i>et al.</i> , 2000 |
| Fertilizante orgánico | Bressani y Braham, 1980 Molina <i>et al.</i> , 1990 |
| Setas: la pulpa fermentada y secada puede ser sustrato para el cultivo de setas | Boccas <i>et al.</i> , 1994 |
| Extracción de proteínas | Molina <i>et al.</i> , 1990 |
| Bebidas alcohólicas y refrescante | Raikumar. Rathinavelu, <i>et al.</i> , 2000 |
| Mucilago del café | Rajkumar Rathinavelu, <i>et al.</i> , 2000 |
| Melaza | Molina <i>et al.</i> , 1990 |
| Pulpa de café en alimentos rumiantes. | Molina <i>et al.</i> , 1990 |
| enzimas (α -amilasas, xilasas, pectinasa, lacasa, tanasa, clorogenato hidrolasa. | Molina <i>et al.</i> , 1990 |

Como parte de los nuevos usos de la PC se encuentra la extracción de compuestos fenólicos y AHs, en la Tabla 2.2 se muestran los usos de compuesto extraídos de la PC.

Tabla 2.2 Usos de compuestos extraídos de la pulpa de café

| Compuesto | Aplicaciones | Referencias |
|-------------------|--|---|
| Ácido Clorogénico | 1. Estándares para la industria farmacéutica. | Sigma-Aldrich, 2018 |
| | 2. Reducción de la respuesta temprana de glucosa e insulina en test de tolerancia a la glucosa oral, (OGTT). | Van- Dijk <i>et al.</i> , 2009 Chaves-Ulate <i>et al.</i> , 2018 |
| | 3. Antioxidante. | |
| | 4. Biotransformación a éster fenético del ácido cafeico (CAPE) | Rodríguez-Duran, 2016 |
| Ácido Cafeico | 1. Propiedades antioxidantes. | Van- Dijk <i>et al.</i> , 2009 |
| | 2. Biotransformación a CAPE. | Rodríguez-Duran, 2016 |
| Ácido Quínico | 1. Antioxidante | Chaves-Ulate <i>et al.</i> , 2018 |
| | 2. Astringente | Chaves-Ulate <i>et al.</i> , 2018 |

2.1.3. COMPOSICIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ

La PC contiene una concentración importante de compuestos fenólicos. Como ACL y AHs, como son, ácido cafeico (AC), ácido quínico (AQ) y ácido ferúlico (AF), el ACL es un conjugado de AC y AQ. En la Tabla 2.3 se señala la composición de la pulpa de café.

Tabla 2.3 Composición de la pulpa de café

| Compuesto | Concentración (%) | Referencias |
|-------------------|-------------------|--|
| Fibra | 33-40 | Adams y Ghaly, 2007 |
| Taninos | 1.80-8.56 | Bressani y Braham, 1980 |
| Azúcares | 14.4-27 | Adams y Ghaly, 2007 |
| Fructosa | 10-15 | Adams y Ghaly, 2007; Antier <i>et al.</i> , 199 |
| Sacarosa | 2.8-3.2 | |
| Galactosa | 1.9-2.4 | |
| Pectinas | 6.5-12.4 | Bressani y Braham, 1980 ; Antier <i>et al.</i> , 1993 |
| Lignina | 12.2-21.5 | Bressani y Braham, 1980; Molina <i>et al.</i> , 1990 |
| Celulosa | 17.7-25.3 | Bressani y Braham, 1980; Peñaloza <i>et al.</i> , 1985. |
| Hemicelulosa | 2.3-3.2 | Bressani y Braham, 1980; Molina <i>et al.</i> , 1990 |
| Ácido Clorogénico | 0.23-2.6 | Murthy <i>et al.</i> , 2012; Rodríguez-Duran <i>et al.</i> , 2014) |
| Ácido Cafeico | 0.17-0.31 | Benoit <i>et al.</i> , 2006; Labat <i>et al.</i> , 2000; Torres-Mancera <i>et al.</i> , 2011 |
| Ácido Ferúlico | 0.01-0.024 | Benoit <i>et al.</i> , 2006; Labat <i>et al.</i> , 2000; Torres-Mancera <i>et al.</i> , 2011 |
| Ácido p-cumárico | 0.08 | Benoit <i>et al.</i> , 2006; Labat <i>et al.</i> , 2000; Torres-Mancera <i>et al.</i> , 2011 |
| AHC totales | 0.298-1.6 | Rodríguez- Duran 2016 |

2.1.4 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos como su nombre lo indica se derivan de un compuesto aromático simple, fenol. Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas y están involucrados en los sistemas de protección contra la invasión de insectos, bacterias, hongos y virus (Friedman y Jurgens, 2000); son compuestos que poseen en su estructura un anillo bencénico sustituido por al menos un grupo hidroxilo (OH) (Figura 2.1). Los compuestos que presentan varios grupos hidroxilo se les denomina polifenoles (Waterman y Mole, 1994).

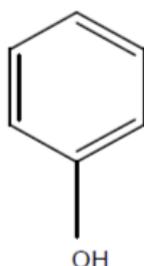


Figura 2.1 Esquema de fenol

Los compuestos fenólicos se clasifican en base al número de anillos presentes en su estructura. Los compuestos fenólicos sintetizados por la ruta del ácido shikimico, como son los AHCs (C₆-C₃) al unirse por un enlace éster al AQ dan lugar a la familia de los ACL (Torres-Mancera, 2013). En la Tabla 2.4 podemos observar la clasificación de compuestos fenólicos según su número de carbonos (Crozier *et al.*, 2006; Baqueiro-Peña, 2010).

Tabla 2.4 Clasificación de compuestos fenólicos

| Estructura | Clase |
|--|--------------------------------------|
| C ₆ | Fenoles simples |
| C ₆ -C ₁ | Ácidos fenólicos y compuesto afines |
| C ₆ -C ₂ | Acetofenonas y ácidos fenil acéticos |
| C ₆ -C ₃ | Ácidos cinámicos y compuestos afines |
| C ₆ -C ₃ | Cumarinas y afines |
| C ₆ -C ₃ -C ₆ | Flavonoides y a fines |
| C ₆ -C ₃ -C ₆ | Antocianidinas y compuestos afines |
| C ₆ -C ₁ -C ₆ -C ₆ -C ₂ -C ₆ | Benzofenonas, Xantonas y Stilbenos |
| C ₆ -C ₁₀ -C ₁₄ | Quinonas |
| C ₁₈ | Betacianinas |
| Lignanos, Neolignanos | Dímeros u Oligómeros |
| Lignina (C30) | Polímeros |
| Taninos (C14-C14) | Oligómeros o Polímeros |
| Flobafenos (C 28) | Polímeros |

2.1.5 COMPUESTOS HIDROXICINÁMICOS

Los ácidos hidroxicinámicos pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos no flavonoides. Su estructura consiste en un anillo bencénico asociado a una cadena de tres carbonos de estructura C6-C3 (Andersen y Markham, 2006)

Los AHs derivan del ácido cinámico, dentro de los más comunes se encuentran el AF, AC, Ap-C, AQ, ácido sinapínico (Figura 2.2), son los compuestos centrales en la biosíntesis de los polifenoles.

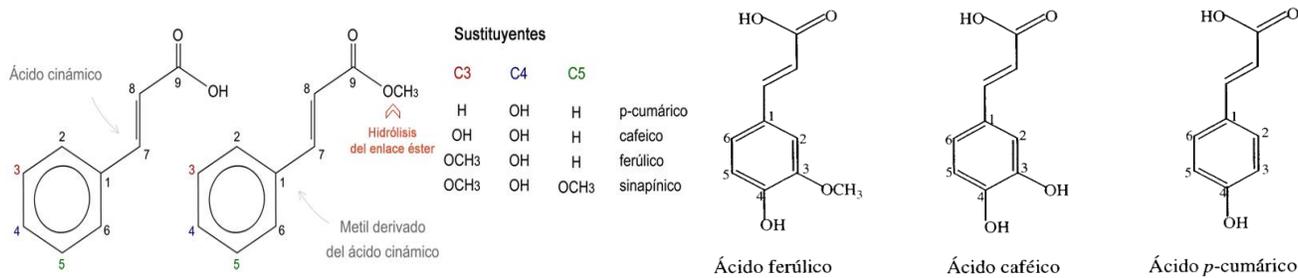


Figura 2.2 Principales ácidos hidroxicinámicos (Andersen y Markham, 2016)

La vía del ácido shikímico parte de la fenilalanina, la cual ingresa a la vía del ácido propenoico y es convertida en ácido trans cinámico por una enzima amonio liasa, seguido de la hidroxilación de la posición 4 del anillo aromático, lo que da lugar al ácido 4-hidroxicinámico o p-cumárico. Una posterior hidroxilación de la posición 3 del anillo aromático forma el ácido caféico y la subsecuente o-metilación permite la formación del ácido ferúlico (Rechner *et al.*, 2001). Figura 2.3 se muestra la representación de la vía de transformación de los principales AHs (Torres- Mancera, 2013).

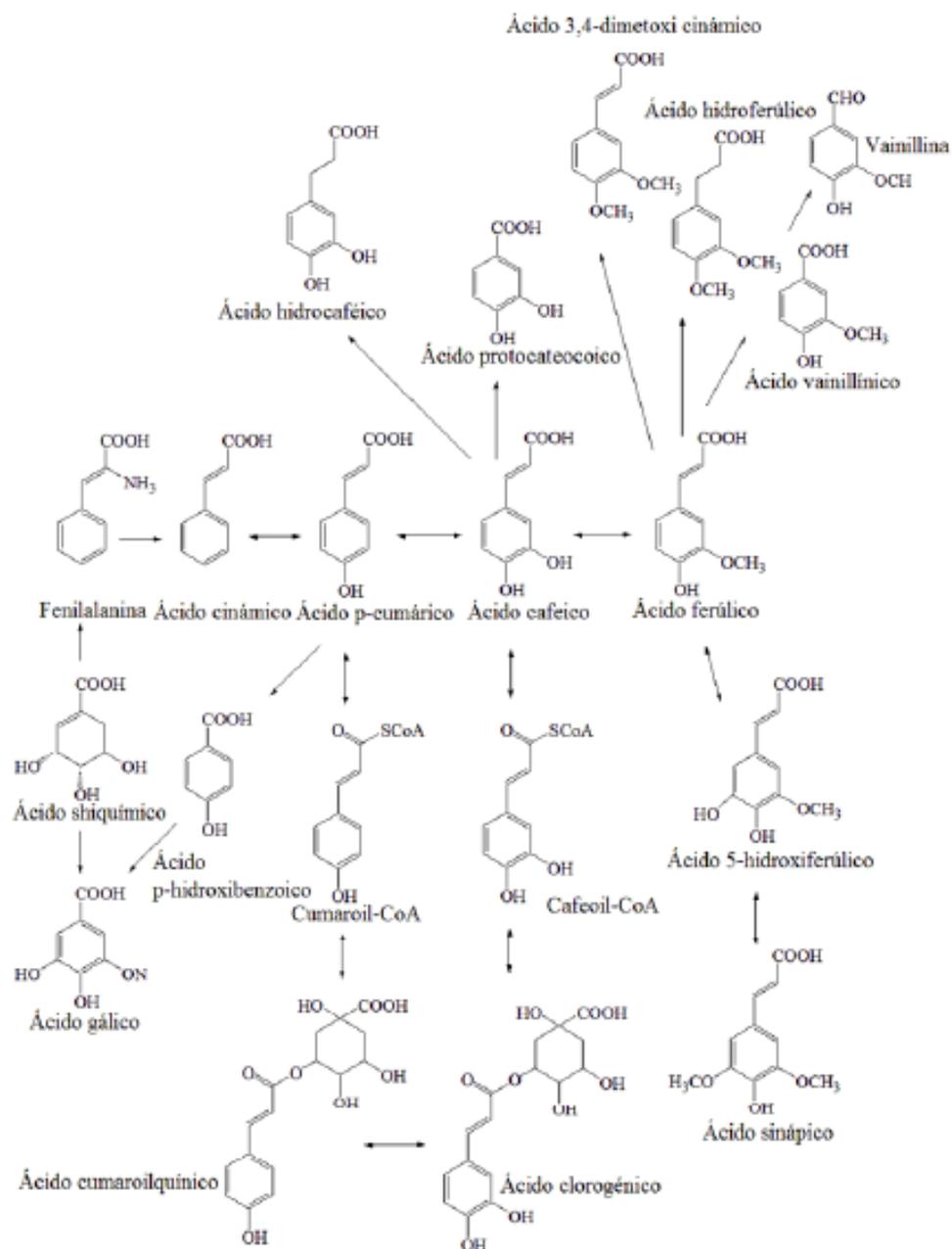


Figura 2.1 Representación de la vía de transformación de los principales ácidos hidroxicinámicos (Torres-Mancera, 2013)

2.1.6 ÁCIDO CLOROGÉNICO

El ácido 5-o-cafeoilquinico, frecuentemente conocido como ACL se encuentra distribuido en las hojas de mate y en granos de café (Crozier *et al.*, 2006). El ACL es un

conjugado de AC y AQ (Figura 2.4). El ACL es el ácido fenólico más abundante presente en la PC, está en una proporción de 2.3 a 26 g /kg de PC base seca (BS) (Murthy *et al.*, 2012; Ramírez-Velazco *et al.*, 2016; Rodríguez-Duran, 2016), y representa entre el 51% y el 91 % de los AHs totales presentes en la PC (Ramírez-Martínez, 1988; Clifford y Ramírez-Martínez, 1991a; Clifford y Ramírez-Martínez, 1991b; Ramírez-Coronel *et al.*, 2004; Ramírez-Coronel *et al.*, 2007, Rodríguez-Duran 2016).

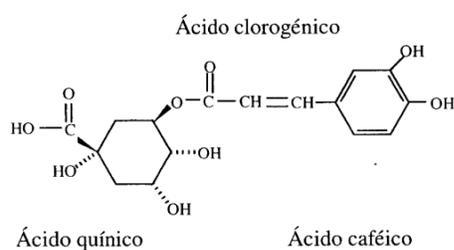


Figura 2.2 Ácido clorogénico (éster de los ácidos quínico y cafeico) x/(Torres-Mancera, 2013)

El ACL es un compuesto polifenólico y presenta actividad antioxidante, antidiabética, antihiper glucémica, antiestrés, antiviral, anticarcinogénica, y antiinflamatoria; es usado en la producción de químicos para consumo humano, industria alimentaria, aditivos en cosméticos, así como modificador del sabor e inhibidor de la glucosa-6-fosfatasa (Solís y Herrera, 2005). Su precio en el mercado es de aproximadamente \$16 000/kg, y es extraído con disolventes orgánicos a partir de granos de café verde con una pureza >95% (Torres-Mancera, 2013). Un análisis económico realizado muestra que las utilidades que se pueden obtener por tonelada de PC procesado para la obtención de compuestos fenólicos pueden alcanzar cerca de los \$45 000/ton. El ACL representaría el 84.3% de las utilidades, seguido del AC con un 5.9% y el AF con un 2.3%. Por lo que resulta de interés la extracción del ACL, un producto de alto valor

agregado de un residuo de bajo valor como es la PC (Torres-Mancera, 2013). La extracción con solventes es el método convencional para la obtención de estos compuestos, pero este proceso causa contaminación por lo anterior es de especial interés encontrar enzimas que permitan obtener ACL, este puede ser biotransformado de manera amigable con el medio ambiente por hongos y bacterias. La enzima clorogenato hidrolasa es la responsable de romper el enlace éster entre el AC y el AQ (Figura 2.5), aumentando la biodisponibilidad de estos compuestos (Adachi *et al.*, 2008).

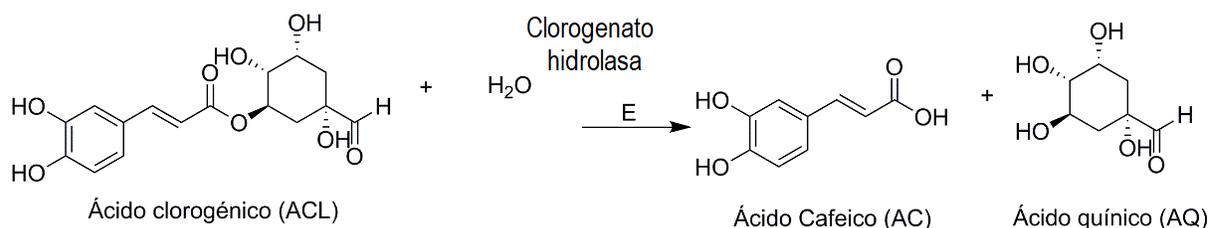


Figura 2.3 Hidrólisis enzimática de ácido clorogénico, para su disociación en ácido cafeico y ácido quínico (Rodríguez-Duran, 2016)

2.2 ENZIMAS CAPACES DE HIDROLIZAR ÁCIDO CLOROGÉNICO

Debido a que la extracción de AHs y sus derivados requiere la utilización de solventes orgánicos contaminantes, en los últimos años la comunidad científica se ha interesado en obtener ACL y sus derivados por vía enzimática. Las feruloil esterases (FE; EC 3.1.1.73) y clorogenato hidrolasa (CH; EC 3.1.1.42) son carboxil-éster hidrolasas capaces de liberar ácidos fenólicos.

2.2.1 CLOROGENATO HIDROLASAS

La clorogenato hidrolasa (EC 3.1.1.42) (CH) es una enzima que hidroliza el ácido ACL para disociarlo en AC y AQ. Esta enzima también actúa (lentamente) sobre otros ácidos cafeoilquínicos (Mateos *et al.*, 2009; Rodríguez-Duran, 2016). Schöbel y Pollmann (1980) aislaron y caracterizaron por primera vez una esterasa específica capaz de hidrolizar el ACL a partir de una pectinasa comercial de *A. niger*. Ellos también probaron distintos sustratos y demostraron que la enzima fue inactiva sobre acetiltiocolina, butirato de etilo, butirato de metilo, acetato de 1-naftilo, acetato de 2-naftilo, etil éster de ácido DL-*p*-amigdalico y aceite de girasol.

Asther *et al.*, (2005) purificaron y caracterizaron dos esterasas producidas por *A. niger* en un cultivo líquido usando pulpa de remolacha azucarera como fuente de carbono e inductor y encontraron que una de las enzimas tuvo actividad sobre ACL y sobre ésteres de AHs (ferulato de metilo, cafeato de metilo, *p*-cumarato de metilo y sinapato de metilo), por lo que fue identificada como una feruloil esterasa. La otra enzima sólo fue activa sobre ACL, por lo que fue identificada como clorogenato hidrolasa. Posteriormente, el gen que codifica para esta proteína fue clonado y sobre expresado (Benoit *et al.*, 2007).

En cepas de *Aspergillus* la producción de CH es inducida al usar salvado de trigo en fermentación en medio sólido (FMS), (8 días) y al usar pulpa de remolacha azucarera (Adachi *et al.*, 2008) en medio líquido (11 días). La pulpa de café al ser impregnada con medio Czapek también promueve la inducción de la CH. Schobel y Pollmann en 1980 y Barde y Dubourdie en 1998 aislaron una CH (EC 3.1.1.42) de un extracto enzimático pectinolítico producido por *A. niger*.

La CH se expresa generalmente con muy bajos títulos de actividad en cepas silvestres. Por ejemplo, se han obtenido actividades de 0.02 a 0.03 U/mL para *A. niger* y *A. sojae* en cultivo

líquido (Asther *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2008) y de 0.13 a 1.2 U/g de soporte para *A. japonicus* y *A. ochraceus* en FMS (Okamura y Watanabe, 1982; Ramírez *et al.*, 2008). Por otro lado, usando una cepa modificada de *A. niger* se han obtenido títulos de hasta 8.4 U/mL (Benoit *et al.*, 2007).

2.2.2. FERULOIL ESTERASAS

Las feruloil esterasas (E.C 3.1.1.73) (FE) catalizan la hidrólisis del enlace éster entre polisacáridos de la pared celular de las plantas y ácidos fenólicos (Pandey *et al.*, 2000; Ramírez-Velazco, 2016; Rodríguez-Duran, 2016). Las FE se clasifican en cuatro tipos (A, B, C y D), con base en su secuencia primaria y su capacidad de hidrolizar cuatro-metil esteres de AHs (Crepin *et al.*, 2004). Las FE tipo A muestran una mayor especificidad por los esteres de AHs metoxilados (ferulato de metilo y sinapato de metilo), mientras que las FE tipo B tienen mayor afinidad por los esteres de AHs hidroxilados (cafeato de metilo y *p*-cumarato de metilo). Las FE tipo C y D son inespecíficas ya que hidrolizan los cuatro sustratos de manera indistinta. En la Tabla 2.5 se muestran algunos valores de K_m y V_{max} para CH aisladas de cepas de *A. niger*.

Tabla 2.5 Constantes cinéticas de las clorogenato hidrolasas en presencia de ácido clorogénico

| Microorganismos | K_m | V_{max} | Referencia |
|--------------------------|------------|--------------|------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 0.7 mM | | Shöbel-Pollmann, 1980 |
| | 10 μ M | 140 nkat/ mg | Asther <i>et. al.</i> , 2004 |
| | 6 mM | 250 nkat/mg | Benoit <i>et. al.</i> , 2007 |
| | 2 mM | | Negrel <i>et. al.</i> , 2016 |

Estas enzimas permiten liberar los AHs a partir de productos y subproductos agrícolas como el salvado de trigo, el salvado de maíz, la pulpa de remolacha y la pulpa de café. Está es la razón por la que estas enzimas han sido estudiadas con gran interés durante los últimos años (Faulds y Williamson, 1991; Kroon y Williamson, 1999; Torres- Mancera, 2013).

Los hongos filamentosos en particular del género *Aspergillus*, son los principales productores de FE y CH, estos pueden ser cultivados en sistemas de cultivo sumergido y cultivo en medio sólido. El sistema en medio sólido tiene una mayor productividad volumétrica, menor represión catabólica e incluso mayor estabilidad en algunas preparaciones enzimáticas. El precio en el mercado de ACL, AC y AQ varía dependiendo su grado de pureza algunos ejemplos de encuentra en la Tabla 2.6

Tabla 2.6 Precios en el mercado de ACL, AC y AQ

| Compuesto | Cantidad (g) | Precio (\$) | Referencia |
|-------------------|--------------|-------------|-----------------------------|
| Ácido clorogénico | 1-5 | 2,000-8,000 | Sigma-Aldrich, 2020 (MERCK) |
| Ácido cafeico | 1- 5 | 1,000-2,000 | Sigma-Aldrich, 2020 (MERCK) |
| Ácido quínico | 25-100 | 1,500-5,000 | Sigma-Aldrich, 2020 (MERCK) |

2.3 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

La FMS es un proceso microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con y sin materiales

solubles (Lonsane *et al.*, 1985; Viniestra *et al.*, 1997). Los materiales sólidos pueden ser biodegradables, por ejemplo, pulpa de café y almidón, o inertes como el poliuretano o agrolita. El crecimiento de los microorganismos en FMS requiere que éstos crezcan sobre un soporte que difunda nutrientes, bajo una atmósfera gaseosa (Viniestra- González *et al.*, 2003; Torres-Mancera, 2013).

La FMS tiene un gran potencial para la producción de enzimas, principalmente en aquellos procesos donde el producto crudo de la fermentación puede ser usado directamente como fuente de enzimas o alimento. Los principales factores que afectan la síntesis enzimática y el crecimiento de los microorganismos en FMS incluyen la selección adecuada del sustrato o soporte inerte, tamaño de partícula, espacio inter-partícula y área superficial, contenido de humedad y actividad de agua (a_w) del sustrato, humedad relativa de la atmósfera gaseosa, tipo y tamaño de inóculo, control de la temperatura durante la fermentación y remoción del calor metabólico, tiempo de cultivo, como control en la uniformidad de las condiciones ambientales durante la fermentación, velocidad de consumo de oxígeno y velocidad de liberación de CO_2 (Pandey *et al.*, 1999; Torres-Mancera, 2013).

2.4 PARÁMETROS CINÉTICOS DE MICHAELIS- MENTEN K_m Y V_{max}

Para la determinación de parámetros cinéticos el método más antiguo consiste en la determinación de la velocidad de reacción y su variación con respecto a cambios experimentales, uno de los factores clave que afecta la velocidad de una reacción es la concentración de sustrato presente, y su variación con respecto al tiempo. El modelo de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas y requiere de algunas consideraciones. (Ancheyta-Jorge, 2017).

1. A mayores concentraciones de [S], los incrementos de velocidad inicial (V_0) se hacen menores a medida que la concentración de sustrato [S] aumenta.
2. Después de una cierta concentración de sustrato [S], la velocidad inicial (V_0) ya no aumenta, alcanzando así su velocidad máxima (V_{max}) como se muestra en la Figura 2.6.

En 1913 Michaelis-Menten propusieron la expresión que sigue vigente

Ecuación 2.1 Ecuación de Michaelis-Menten

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Donde

K_m es la constante de Michaelis

V_{max} es la velocidad máxima y

[S] es la concentración de sustrato

Para predecir el comportamiento de un sistema enzimático es necesario determinar V_{max} y K_m , esto puede realizarse midiendo la velocidad inicial de la reacción en un rango de concentraciones de sustrato.

La velocidad máxima de reacción (V_{max}) representa la máxima eficiencia catalítica de cierta cantidad de enzima, cuando $V = V_{max}$ todos los sitios activos están ocupados y no hay moléculas libres de enzima en este punto la saturación está al 100%. Cuando la saturación está al 50 % es decir $V = \left(\frac{1}{2}\right) V_{max}$ la ecuación de Michaelis-Menten establece que $K_m = [S]$. De esta manera, K_m (con unidades de concentración) representa la cantidad de sustrato que se

necesita para saturar la mitad de la enzima disponible y producir la mitad de la velocidad de reacción máxima (Ancheyta-Jorge, 2017).

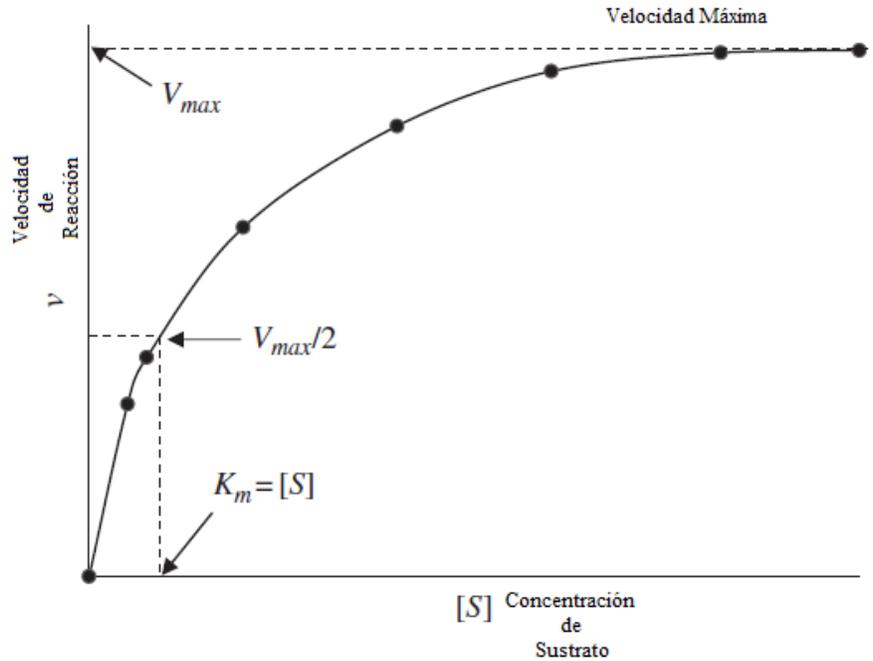


Figura 2.4 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de una reacción catalizada por una enzima (Ancheyta-Jorge, 2017)

2.4.1 ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS A TRAVÉS DE MODELOS DE REGRESIÓN LINEAL

La ecuación de Michaelis-Menten se puede transformar algebraicamente en expresiones útiles para representar los datos, los métodos de linearización más utilizados para el cálculo de K_m y V_{max} están descritos en la (Tabla 2.7), depende de los datos utilizados, pero Hanes-Wolf representa los datos experimentales de mejor manera pues presenta los valores más altos de coeficiente de correlación (Ancheyta-Jorge, 2017).

Tabla 2.7 Modelos de regresión lineal para cinéticas con comportamiento de Michaelis-Menten

| Método | Ecuación | Gráfica |
|-------------------|--|---------|
| Lineweaver – Burk | $\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) * \left(\frac{1}{[S]}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right)$ | |
| Eadie – Hofstee | $V = V_{max} - K_m * \left(\frac{V}{[S]}\right)$ | |
| Hanes – Wolf | $\frac{[S]}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) * [S]$ | |

3.- ANTECEDENTES DIRECTOS EN EL LABORATORIO

El primer trabajo fue realizado por Suzuki-López (1999), quien realizó estudios sobre el uso de bacteria lácticas para la conservación de pulpa de café. Evaluó el aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas para la conservación de pulpa de café por ensilaje, encontró 31 cepas de bacterias gram positivas en forma de bacilos. En el ensilaje natural predominan las bacterias lácticas de la microflora epifita dominan la fermentación y tienen la capacidad de crecer en medio con pectina. Posteriormente Gerardo Gutiérrez-Sánchez (2000), realizó estudios sobre la degradación de cafeína. Evaluó la degradación de cafeína en presencia de ácido tánico por *Penicillium commune* V33A25, encontró que degrada el 96 % de cafeína, utilizó una relación C/N de 50 usando sacarosa y cafeína, encontró actividad enzimática cafeína desmetilasa. Barreto-Castro (2001), realizó estudios de utilización de pulpa de café. Evaluó la utilización de pulpa de café como complemento en dietas para crías de tilapia *Oreochromis niloticus*, en la que encontró que después de la quinta semana de alimentación con pulpa de café seca y fermentada las crías de tilapia presentaron un mayor crecimiento. Posteriormente Ruiz-Sánchez (2002), realizó estudios sobre la producción de esterasas por *Aspergillus awamori*. Evaluó la producción de cafeoil, feruloil y p-cumaroil esterasas por *A. awamori* NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono, la cafeoil esterasa crece en todos los medios probados, excepto con xilano de avena, si el xilano de avena es mezclado con ácido ferúlico, se producen cafeoil esterasa I y feruloil esterasa. Isaías Nava- Villagómez (2003), realizó estudios de fermentación de pulpa de café. Evaluó la fermentación de pulpa de café con *Penicillium commune* a nivel laboratorio y semi-piloto. A nivel laboratorio las condiciones

fueron humedad inicial 65 %, concentración de inoculo 1×10^7 esporas/g MS, temperatura 25 °C, con estas condiciones a nivel semi piloto se evitaron problemas de contaminación en el que se observó una alcalinización del medio sugiriendo así la degradación de la cafeína, En 2006 publicó un artículo en el que Realizo estudios a nivel planta piloto en un reactor de listones helicoidales sobre pulpa de café (PC) en fermentación en medio sólido, para la evaluación del efecto de la duración de tratamiento térmico en PC y el efecto de la temperatura de incubación en el rendimiento de producción de esporas de *Penicillium commune*. Posteriormente en 2011 publicó un artículo en el que evaluó la producción de enzima pectilesterasa, crecimiento y el efecto que el mezclado tiene en reactores a nivel planta piloto, determinando que no existe diferencia significativa en el crecimiento y la producción de enzimas y que el mezclado suave no daña el micelio del hongo.

Arellano-González (2009), realizó estudios sobre el efecto antioxidante en la pulpa de café. Evaluó la estimación de la capacidad antioxidante de ácidos hidroxicinámicos obtenidos de la pulpa de café, en el compara la capacidad antioxidante de la PC fermentada y la PC no fermentada concluyo que los extractos de la PC fermentada presentan una mejor actividad antioxidante a pesar de que contiene menor cantidad de compuestos fenólicos, el contenidos de polifenoles es mayor en la PC no fermentada, la PC fermentada presenta una mayor concentración de polifenoles libres debido a la acción enzimática. En 2011 publicó un artículo, en el que resalta los resultados obtenidos. Posteriormente Pérez-Morales (2008), realizó estudios de la producción de enzimas en pulpa de café002C Evaluó la producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio solido en la pulpa de café. Las condiciones óptimas de extracción fueron 34 min y a 56 °C y logro obtener 77.1 mg de ACL, 9.08 mg de AC, 3.10 mg

de Ap-C y 2.74 mg de AF por Kg de PC seca, midió la actividad enzimática la cual fue de 12 nkatal /g MS y una productividad de 7 nkatal/ g MS en 36 días. También realizó un artículo en el año 2011 en el que se resaltan los resultados antes mencionados. Posteriormente Baqueiro-Peña (2010), realizó estudios sobre la biotransformación de ácidos hidroxicinámicos por hongos del género *Aspergillus*. Encontró que en sustrato sólido el proceso de biotransformación de AF a 4-vinilguayacol es casi el doble en comparación con la fermentación en medio sólido. En el caso de la biotransformación de ACL en cultivo líquido encontró que una cepa de *A. niger* produce 400 mg/l de AC y 24 mg/l de ácido protocatecico. Publico un artículo en el año 2010 en el que resalta los resultados antes mencionados. Torres-Mancera (2013), presento un artículo basado en la extracción enzimática de ácidos hidroxicinámicos a partir de pulpa de café. Posteriormente en 2013, realizó estudios para la obtención de ácido clorogénico. Evaluó la obtención de ácido clorogénico de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido. Encontró que las cepas *Risopus pusillus* y *Trametes sp.* Presentan la mayor capacidad para extraer ACL por FMS, determino la presencia de la actividad pectinolítica y xilanolítica, determino que tienen efecto importante en la extracción de ACL, por último determino que el extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido por FMS alcanzo rendimientos del 69 %. En 2013 publicó un artículo en que resalta los resultados descritos anteriormente. Rodríguez- Duran (2016)| realizó estudios de bioprocesos usando cepas de *Aspergillus* para obtener el grado de doctorado sobre extracción, purificación y transformación enzimática de ácido clorogénico en pulpa de café, esto por medio de extractos enzimáticos producidos por cepas de *Aspergillus*. Determino que existe una mayor concentración de ácidos hidroxicinámicos en PC obtenida de los frutos semimaduros. Por medio de una extracción asistida por microondas recupero el 71.6 %, con una pureza de 61.7 % y rendimiento de 43.4

%, probo distintas metodologías para la síntesis de CAPE catalizadas por enzimas comerciales y extractos enzimáticos producidos por FMS, concluyendo que se puede extraer, purificar y transformar ACL extraído de la PC para la obtención de compuestos de alto valor agregado como CAPE.

4.-JUSTIFICACIÓN

México es un importante productor a nivel mundial de café. La generación de PC es de alrededor de 100 mil toneladas base seca por año, lo que representa un importante problema de contaminación si no se trata adecuadamente. Se pretende que estos residuos sean tratados mediante procesos biotecnológicos para evitar problemas ambientales y obtener compuestos de alto valor agregado. Por lo que para contrarrestar este problema se propone la obtención de productos de alto valor agregado a partir de esta PC, como el ACL, AC y AQ cuyos valores en el mercado van de \$2,000-8,000/1-5 g, \$1,000-2,000 /1-5 g y \$1,500-5,000/ 25-100 g respectivamente. Esta acción podría ayudar al desarrollo de la cafecultura en nuestro país.

5.- HIPÓTESIS

Los hongos filamentosos aislados del cultivo de café podrían tener actividad clorogenato hidrolasa e hidrolizar el ACL en AC y AQ.

6.- OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar estrategias para la extracción y transformación de ACL empleando hongos filamentosos con actividad clorogenato hidrolasa cultivados en medio sólido.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluación de cepas fúngicas con actividad clorogenato hidrolasa a partir de cepas aisladas del cultivo del café.
2. Caracterizar morfológicamente las cepas seleccionadas.
3. Producir enzimas con actividad clorogenato hidrolasa empleando hongos filamentosos cultivados en medio sólido.
4. Obtener un extracto enzimático y realizar el análisis cinético de la hidrólisis del ácido clorogénico en ácido cafeico y ácido quínico.
5. Estimar los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para cada una de las cepas aisladas.

7.- MATERIALES Y METODOS

7.1 ORIGEN DE CEPAS

Se utilizaron 8 cepas de hongos filamentosos, del género de *Aspergillus*, 2 cepas aisladas de café y que pertenecen a la colección del proyecto Angélica (ANR - CONACYT (FONCICYT 259874), y el resto al cepario de la Planta Piloto 4, todas de la Universidad Autónoma metropolitana (UAM-I). En la Tabla 7.1 se muestran el nombre y origen de cada una de ellas.

Tabla 7.1 Origen de cepas utilizadas

| Cepa | Origen |
|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> GH1 | Hojas de gobernadora |
| <i>Aspergillus niger</i> PSH | Hojas de pino silvestre |
| <i>Aspergillus niger</i> HT4 | Tronco de eucalipto |
| <i>Aspergillus tamaraii</i> V12307 | Plantación de café |
| <i>Aspergillus oryzae</i> 2094 | Salsa de soya |
| <i>Aspergillus japonicus</i> AN5 | Suelo cercano a un eucalipto |
| <i>Aspergillus niger</i> CBR16-4 | Cultivo café Robusta, Veracruz |
| <i>Aspergillus niger</i> CBA16-6 | Cultivo café Arábica, Veracruz |

7.2 PROPAGACIÓN Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

Las cepas se propagaron en Agar Papa Dextrosa (BD Bioxon ®), en matraces de 250 mL, se incubaron durante 7 días a 30 °C. Para su conservación se realizaron dos metodologías una a corto plazo y una a largo plazo. Para ambos procedimientos se propagaron las cepas de la forma descrita anteriormente se cosecharon esporas con 20 mL de Tween 80 al 0.1 %, para la conservación a largo plazo se utilizó la criopreservación, en crioviales se colocaron 0.5 mL de glicerol y 0.5 mL de caldo Czapek (BD Bioxon ®) se esterilizaron en condiciones estándar

(121°C, 15 psi por 15 min), y se inocularon con 1 mL de solución de conidios, por último se preservaron a -18 °C. Para la conservación a corto plazo se propagaron las cepas en cajas de Petri incubadas a 30 °C por 7 días. Una vez transcurrido el tiempo se cortaron cuadros de 1 x 1 cm con un bisturí estéril y se colocó un cuadrado en un vial de 5 mL que contenía 3 mL de agua destilada estéril, y se conservaron a 4 °C. μ

7.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS FÚNGICAS

Para la evaluación macroscópica, primero se preparó PDA, se esterilizó y vertió en placas de Petri, posteriormente se inocularon con una concentración de 1×10^8 conidios por mL (ANEXO 1), para la observación de características fenotípicas para cada una de las cepas evaluadas.

Para cada cepa a evaluar, *A. niger* GH1, *A. niger* PSH, *A. niger* HT4, *A. tamarii* V12307, *A. oryzae* 2094, *A. japonicus* AN5, y las dos cepas recientemente aisladas de los cultivos de café, *A. niger* CBR 16-4 aislado de *Coffea canephora* y CBA16-6 aislado del *Coffea arabica*. Se realizaron microcultivos, para lo cual se tomó una caja Petri con PDA en condiciones estériles, con un bisturí (estéril) se cortaron cuadros de aproximadamente 1 cm de lado y se colocaron 4 cuadros en cada caja de Petri. Sobre cada cuadro de agar se colocaron 15 μ L de suspensión de conidios con una concentración de 1×10^8 conidios por mL (ANEXO 1). Los análisis se hicieron para corroborar que se trataba de cepas de *Aspergillus*, los datos obtenidos pueden ser utilizados en análisis posteriores, y determinar qué tipo de cultivos deben ser utilizados. Posteriormente se colocó un cubreobjetos a cada cuadro de agar, las cajas de Petri se incubaron a 30 °C durante 72 horas, pasado este tiempo se retiraron los cubreobjetos y se colocaron en un portaobjetos con una solución de azul de lactofenol y alcohol etílico 1:1 (v:v)

(ANEXO 2). Las preparaciones se observaron al microscopio y se tomaron microfotografías, con ayuda del software AmScope (84x). Posteriormente las imágenes se analizaron con software *Image J* tomando como referencia de calibración la distancia entre los cuadros de la región central de la cámara de Neubauer (50 µm de distancia lineal). Lo anterior se hizo para determinar las características microscópicas como tamaño, longitud y diámetro de hifa, así como identificar si se trata de un hongo septado o no.

7.4 SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS QUE PRODUCEN CLOROGENATO HIDROLASA

Se evaluaron dos cepas de *A. niger*, ambas aisladas del cultivo de café, *A. niger* CBA16-6 y CBR16-4, se utilizó un control positivo *A. tamarii* V12307 y un control negativo *Beauveria bassiana*. Las cepas se inocularon en placas con medio Asther modificado, compuesto por (en g/L): Tartrato de diamonio, 1.842; extracto de levadura, 0.5; KH₂PO₄, 0.2; CaCl₂·2H₂O, 0.0132; MgSO₄·7H₂O, 0.5; extracto de café verde con ACL como fuente de carbono, 15; y agar 15; Se incubó a 30 °C durante 3 días, en este periodo se midió el crecimiento radial cada 24 horas. A los tres días de incubación se retiraron dos cajas de Petri de cada cepa y se agregaron 2.5 mL de NH₄OH al 28%, se agitó durante 30 segundos y se eliminó el exceso de solución, cada caja de Petri se mantuvo a temperatura ambiente en la campana de extracción de disolventes y después de dos horas se midieron los halos de inhibición y el índice de potencia (Rodríguez-Duran, 2016).

Ecuación 7.1 índice de potencia

$$IP = \frac{Dh}{Dc}$$

Donde:

IP es el índice de potencia

Dh es el diámetro del halo de aclaramiento debido a la hidrolisis de ACL

Dc es el diámetro de la colonia.

7.5 CARACTERIZACIÓN DE PULPA DE CAFÉ

Se seleccionó el fruto semimaduro de dos variedades de café, *Coffea arabica* variedad Costa Rica sembrado fuera de Planta piloto 4 y *Coffea arabica* originario de Chiapas, se lavó con abundante agua y posteriormente se despulpó con una despulpadora manual. Se secó por 72 h en un secador de charolas con corriente de aire forzado a una temperatura de 40 °C. Una vez seco se molió y se tamizó con malla N°20 y se utilizó la PC tamizada que salió directamente del tamiz, y posteriormente se realizó la extracción de AHs solubles e insolubles.

7.5.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS

Una de las aplicaciones más atractivas para el aprovechamiento de la PC consiste en la extracción de compuestos fenólicos, debido a su alto valor comercial

7.5.1.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS SOLUBLES.

Se pesaron 2 g de PC seca en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se extrajo con 20 mL de hexano, se colocó en un shaker durante 30 min a 30 °C y se agito a 150 rpm, la fase orgánica fue desechada y el procedimiento se repito 2 veces más, posteriormente se extrajo con 20 mL de metanol acuoso (80% v/v + 1% de ácido acético) para lo cual se colocó en un shaker a 150 rpm una temperatura de 55 °C por 35 min y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante

30 min. El sobrenadante se filtró a través de membranas de celulosa regenerada con un tamaño de poro de 0.22 μm , para su posterior análisis por HPLC.

7.5.1.2 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS INSOLUBLES

Para la extracción de AHs insolubles se realizaron los dos primeros pasos descritos para la extracción de AHs solubles. Posteriormente se tomó la PC a la que se le realizaron las extracciones anteriores y se hidrolizó con 20 mL de NaOH a una concentración 2.0 M con EDTA (10 mM) y ácido ascórbico (1% p/v) en proporción 1:1:1(v:v:v). La muestra se incubó a 40 °C durante 4 h con una agitación de 150 rpm, el pH se ajustó a 3 ± 0.1 con una solución de 6 M de HCl. La mezcla se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado del número 2, el residuo fue recuperado y posteriormente se extrajo con 10 mL de agua destilada, se mezclaron los extractos y se filtraron a través de membranas de celulosa regenerada de 0.22 μm . Finalmente, las muestras fueron analizadas por HPLC; cada análisis se realizó por triplicado, los extractos se conservaron a -18 °C.

7.6 CUANTIFICACIÓN DE AHs POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

Para la cuantificación de ACL y de AHs obtenidos en la extracción metanólica e hidrólisis alcalina, se realizó una curva de calibración con estándares internos de cada compuesto (ACL, AC, Ap-C y AF). Para lo cual se realizó la preparación de una solución madre con una concentración 0.5 g/L y se realizaron diluciones para tener una curva de calibración con concentraciones de 0.025 g/L a 0.5 g/L. El análisis fue realizado por medio de un sistema HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), con una bomba LC-20AT, una unidad desgasificadora DGU-20AS, un automuestreador SIL-20A HT, un detector de arreglo de

diodos (PDA) SPD-M20A y un horno CTO-20A, con una columna Thermo Scientific C-18 (250 x 4.6mm x 5µm). Para el análisis se utilizó un método isocrático con una fase móvil compuesta por metanol, ácido acético y agua (35, 1.25 y 63,75 % v/v, respectivamente) a un flujo de 1 mL/min durante 15 minutos, a una longitud de onda de 320 nm (Rodríguez- Duran, 2016).

7.7 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO PRODUCCIÓN DE EXTRACTO ENZIMÁTICO

7.7.1 SOPORTE SÓLIDO PULPA DE CAFÉ

Para la fermentación en medio sólido se desarrollaron dos condiciones una con PC como soporte y sustrato (condición 1) y otra con PC como soporte adicionada de glucosa (condición 2). Para ambas condiciones se utilizaron 10 unidades experimentales (columnas de vidrio); en cada una de ellas se colocaron 7.5 g de PC, seca, tamizada (malla 12-16), la PC fue sometida a un tratamiento térmico colocándola en una atmósfera de vapor a ebullición durante 15 min. La humedad se ajustó al 60% agregando agua destilada e inóculo para la condición 1 PC sin glucosa. Para la condición 2 PC con glucosa la humedad se ajustó con inóculo y medio de cultivo compuesto por (g/L): Glucosa, 5.5; KH_2PO_4 , 0.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 0.0132; para ambas condiciones se colocó un inóculo de 2×10^7 esporas/g materia seca. Posteriormente se incubó a 30 °C por 60 y 72 h a un flujo de aire de 20 mL/min se tomaron muestras cada 12 h.

7.7.2 SOPORTE SÓLIDO AGROLITA

Para la fermentación en medio sólido usando agrolita como soporte, esta se lavó con agua caliente y agua fría posteriormente se secó, se tamizó (malla 12-16) y esterilizó bajo condiciones convencionales, se colocaron 60 g de agrolita en un vaso de precipitados de 500 mL, se agregó medio Asther modificado con la siguiente composición (g/L): tartrato de diamonio, 3.68; extracto de levadura, 1; KH_2PO_4 , 0.4; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0264; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1;

maltosa, 4.0; y extracto de café verde, 30.0. Se inoculó con 1×10^7 esporas /mL, posteriormente se puso en columnas de vidrio esterilizadas, con 7.5 g de agrolita ya preparada y se incubó durante 48 h a 30 °C con una aireación de 20 mL aire/min, el proceso se muestreo cada 12 h en un ensayo preliminar, posteriormente la fermentación solo se incubó durante 12 y 24 h (Rodríguez- Duran, 2016).

7.8 EXTRACTO EZIMATICO

Para la producción de extracto enzimático se tomó cada muestra de las fermentaciones antes mencionadas. Se prepararon 5 g de materia fermentada en un tubo Falcon y se agregaron 12.5 mL de buffer de fosfatos a un pH 6.5, la muestra se agitó por 4 min en un Vortéx y se decantó el sobrenadante el cual se centrifugó a 3500 rpm por 20 min y por último se filtró por membranas de celulosa regenerada de 0.22 μ y se analizó por HPLC.

7.9 REACCIÓN ENZIMÁTICA

Las reacciones enzimáticas se realizaron en dos etapas, para la primera etapa se preparó una solución de ACL 5 mM, se colocaron 900 μ L de esta solución en tubos de vidrio y se preincubaron por 5 min a 37 °C transcurrido este tiempo se agregaron 100 μ L de extracto enzimático y se dejó reaccionar deteniendo la reacción con 1 mL de metanol a 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. El proceso descrito se aplicó para cada tiempo de fermentación 12, 24, 36 y 48 h para cada una de las cepas.

Para la segunda etapa, se tomó el tiempo de mayor actividad medida a 60 min de reacción, con un extracto enzimático obtenido con un cultivo en medio sólido incubado 12 y 24 h, asimismo se varió la concentración de sustrato (ACL) 0.001-28 mM.

7.9.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la caracterización morfológica de cepas fúngicas se tomó en cuenta el criterio de datos atípicos u Outliers, datos atípicos del 10% considerando la distribución de las muestras. El análisis estadístico se realizó con Excel.

Para el modelo logístico del comportamiento de microorganismos, y la determinación de los parámetros cinéticos se utilizó el Excel.

8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CEPAS FÚNGICAS

Se realizaron micro cultivos para las 8 cepas evaluadas todas del género *Aspergillus* esto con el fin de caracterizar longitud y diámetro de la hifa para cada una de las cepas, se tomaron imágenes las cuales se muestran a continuación.

Las Figuras 8.1 muestra un conidióforo de la cepa *A. japonicus AN5*, la Figura 8.2 muestra las hifas y septos captados para la cepa de *A. niger GH1*, con estas imágenes se realizó

la medición de longitud y diámetro de cada hifa para las cepas evaluadas, las mediciones se realizaron con el software image J, se graficó los datos para cada una de las cepas en las que se muestra el comportamiento de la longitud y diámetro de la hifa.

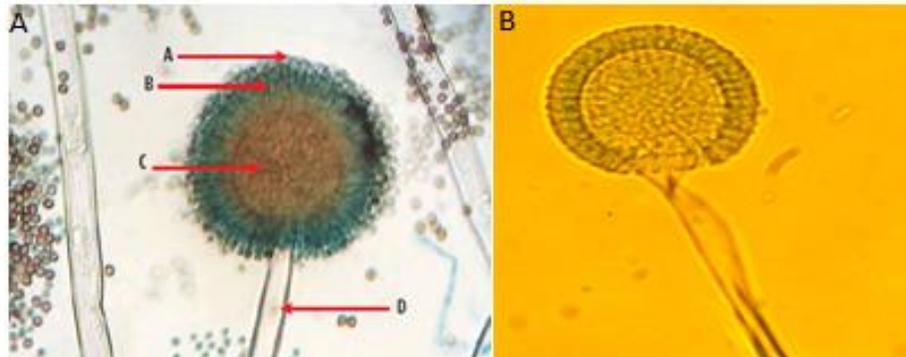


Figura 8.1 A) *A. niger* a) microconidios; b) fiálides; c) vesículas; d) Conidióforo. B) *A. japonicus* AN5, 72 h de incubación

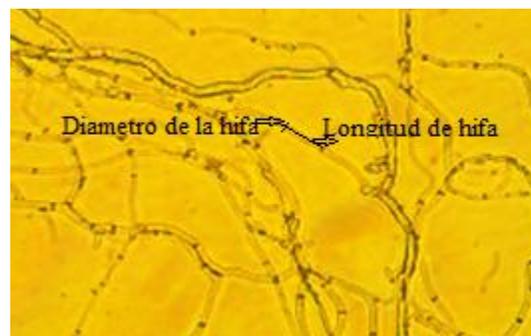


Figura 8.2) Estructuras de las hifas *A. niger* CH1 a 72 h de cultivo.

Las 8 cepas fueron evaluadas y se seleccionaron los datos de menor y mayor relación L/D, los datos completos se describen en el ANEXO 3

Los gráficos muestran el comportamiento de los datos, con el fin de disminuir la dispersión de los datos y reflejar de manera más certera la longitud y diámetro de las hifas se realizó un outlier del 10 %, tal y como se muestra en las figuras 8.3-8.6

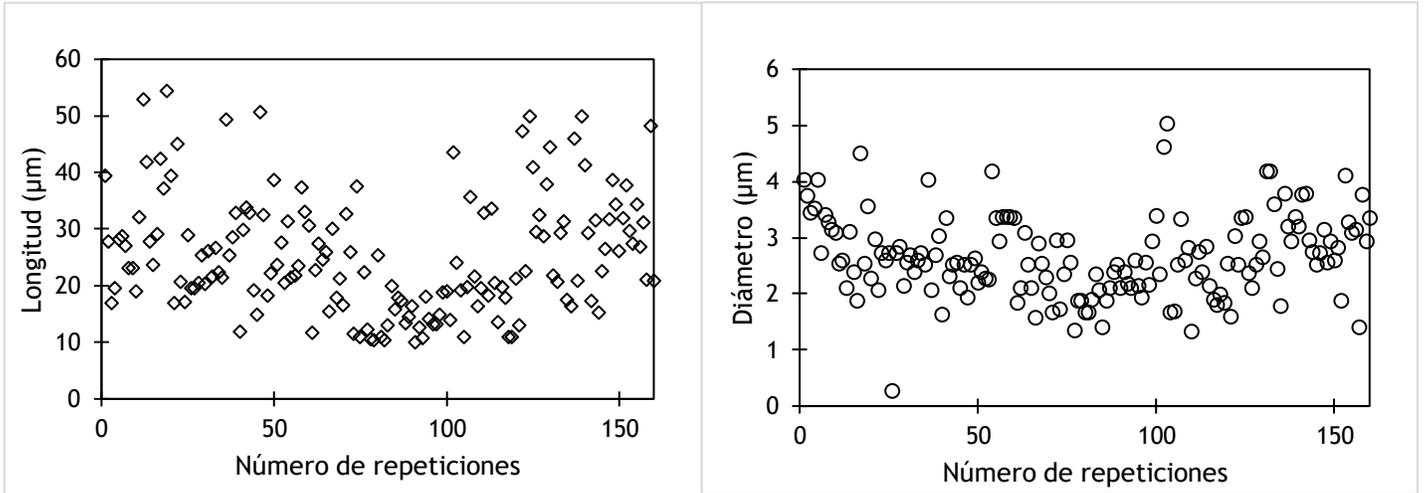


Figura 8.3 Datos originales de longitud y diámetro de las hifas de A. niger CBA16-6 A) longitud y B) diámetro, cepa que presento una mayor relación L/D.

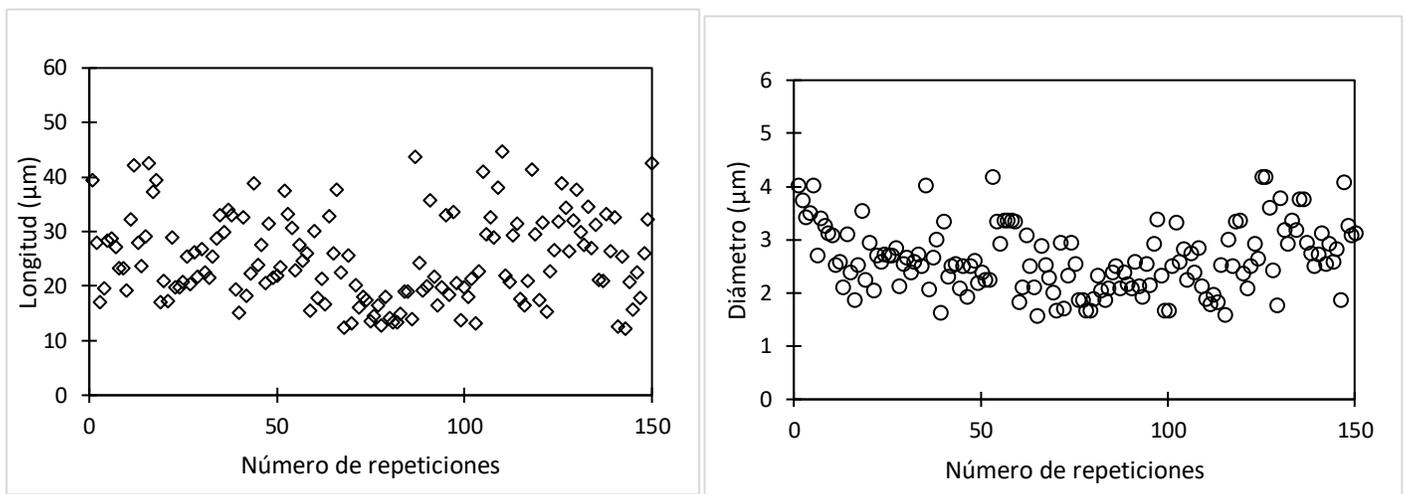


Figura 8.4 Mediciones de las hifas de A. niger CBA16-6 A) longitud y B) diámetro, (outlier 10%) Cepa con mayor relación L/D.

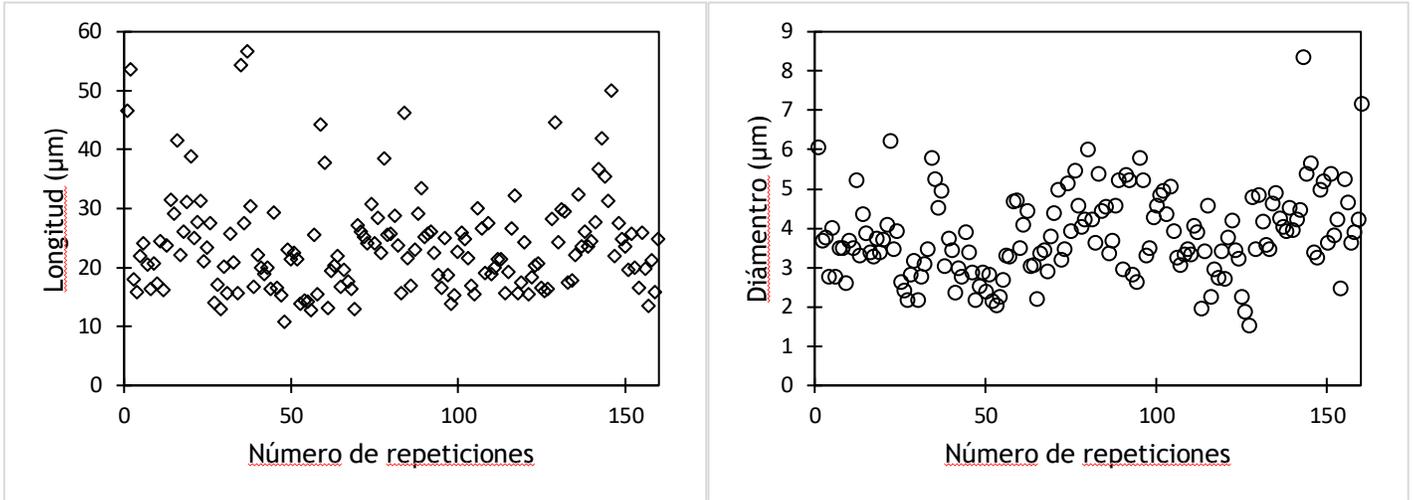


Figura 8.5 Datos originales de longitud diámetro de las hifas de *A. tamarii* V12307 A) longitud y B) diámetro, cepa con menor relación L/D.

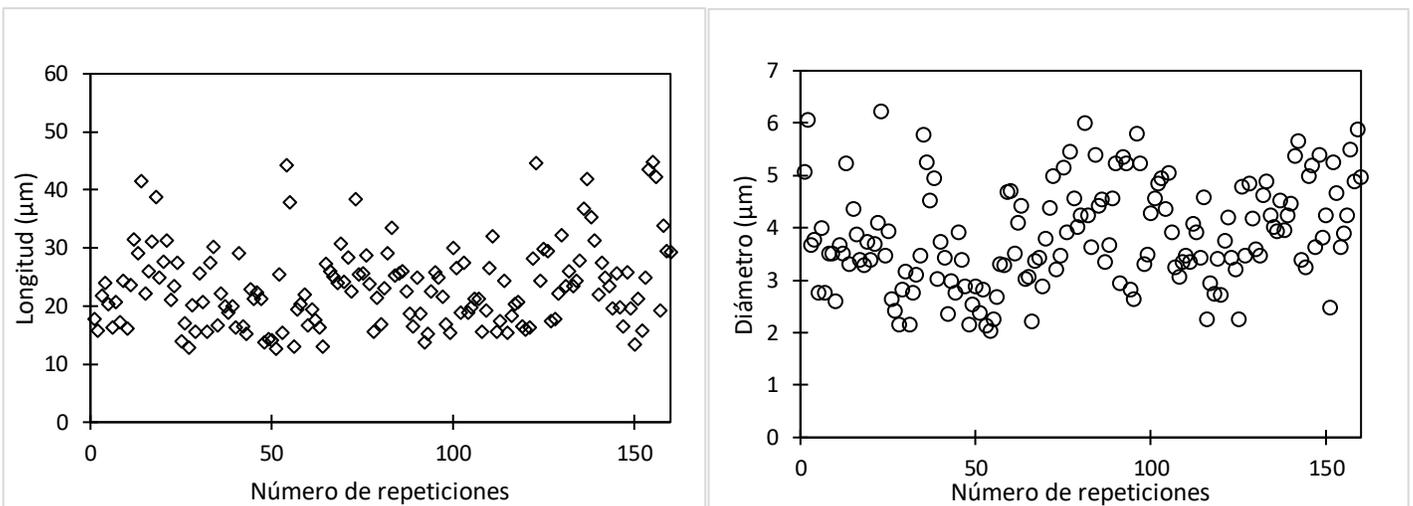


Figura 8.6 Medición de las hifas de *A. tamarii* V12307 A) longitud y B) diámetro. (outlier de 10 %) cepa con menor relación L/D

Tabla 8.1 Promedios para cada longitud y diámetro de las 8 cepas de *Aspergillus* analizadas.

| Cepa | Número de mediciones | Promedio | Desviación STD | CV (%) | Promedio | Desviación STD | CV (%) | L/D |
|--------------------------|----------------------|---------------|----------------|--------|---------------|----------------|--------|-------|
| | | Longitud (μm) | | | Diámetro (μm) | | | |
| <i>A. japonicus</i> AN5 | 160 | 24.69 | 6.20 | 25.10 | 3.84 | 0.72 | 18.81 | 6.42 |
| <i>A. orizae</i> 2094 | 160 | 18.97 | 5.36 | 28.26 | 2.41 | 0.61 | 25.23 | 7.86 |
| <i>A. niger</i> HT4 | 160 | 22.71 | 6.06 | 26.68 | 2.54 | 0.55 | 24.74 | 8.95 |
| <i>A. niger</i> GH1 | 160 | 40.40 | 12.18 | 30.26 | 4.27 | 0.82 | 19.31 | 9.56 |
| <i>A. niger</i> PSH | 160 | 41.54 | 11.83 | 28.47 | 5.43 | 1.15 | 21.26 | 7.65 |
| <i>A. niger</i> CBR16-4 | 160 | 24.87 | 7.94 | 31.90 | 2.68 | 0.62 | 22.99 | 9.29 |
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | 160 | 28.49 | 7.69 | 26.99 | 2.83 | 0.67 | 23.75 | 10.05 |
| <i>A. tamarii</i> V12307 | 160 | 23.72 | 6.94 | 29.24 | 3.90 | 1.95 | 24.37 | 6.09 |

La Tabla 8.1 muestra las relaciones L/D obtenidas, la cepa con una relación L/D más alta es *A. niger* CBA 16-6 con un valor de 10.05 y la más pequeña es para *A. tamaritii* V12307 con un valor de 6.09. Las cepas con una relación L/D más alta son más susceptibles a sufrir daños en sus estructuras en sistemas en cultivo agitado, Kumar y lonsane (1989) no recomiendan la agitación debido al daño que provoca al micelio, en comparación con las relaciones más pequeña las cuales son más resistentes al esfuerzo cortante, estos resultados podrían ser de gran relevancia para la selección del tipo de cultivo en medio sólido a realizar (agitado o estático).

El microcultivos es el procedimiento idóneo para la identificación de estructuras fúngicas, pues permite visualizar al microscopio micelio e hifas, utilizando este método se obtuvo una estimación de la relación longitud y diámetro de las hifas para cada cepa evaluada.

8.2 SELECCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS CON ACTIVIDAD CLOROGENATO HIDROLASA (CH)

Para evaluar el efecto de la CH se usaron las cepas de *A. niger* CBA16-6 y CBR 16-4 y se utilizó un control positivo *A. tamaritii* V12307 y un control negativo *B. bassiana* esta última está reportado que tiene actividad esterasa y quitanasa sobre broca de café, pero no actividad clorogenato hidrolasa, (Valdez *et. al.*, 1999; Acuña, *et. al.*, 2017).



Figura 8.7 *B. bassiana* (control negativo), crecimiento radial a 3 días de incubación a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h.

La Figura 8.7 muestra que no hubo crecimiento para *B. bassiana* en medio con ACL como única fuente de carbono, esto era algo que se esperaba pues esta cepa es un hongo entomopatógeno utilizado para el control biológico de plagas, pero no está reportado que esta cepa sea capaz de hidrolizar el ACL para crecer y por esta razón fue elegida control negativo.

Como control positivo se consideró la cepa de *A. tamaritii* V12307. Está documentado que esta cepa tiene la capacidad de hidrolizar el ACL (Rodríguez-Duran, 2016), y también la capacidad de producir enzimas CH como se muestra en la Figura 8.8 tuvimos crecimientos positivos y la formación de halos de hidrólisis al ser revelados con una solución de NH_4OH al 28 % (Rodríguez-Duran, 2016).

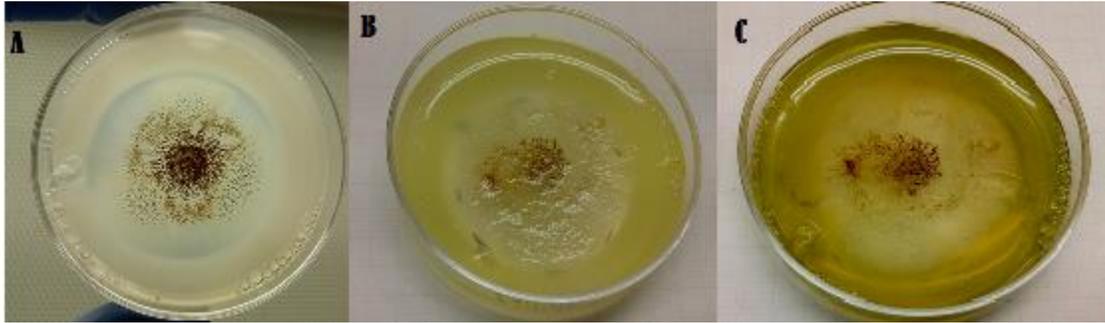


Figura 8.8 *A. tamarii* V12307, crecimiento radial a 3 días de incubación a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h.

Se evaluó el efecto CH de *A. niger* CBA 16-6 y CBR 16-4 cepas recientemente aisladas del cultivo de café arábica y robusta respectivamente. Las Figuras 8.9 y 8.10 muestran el crecimiento y los halos de hidrólisis para cada una de las cepas. En la Figura 8.9 se muestra la cepa de *A. niger* CBA16-6, esta cepa presentó crecimiento después de 24 h, al ser revelado con la solución de NH_4OH al 28%, presentó halos de hidrólisis, lo que indica que puede ser utilizada para la producción de extracto enzimático con actividad clorogenato hidrolasa.

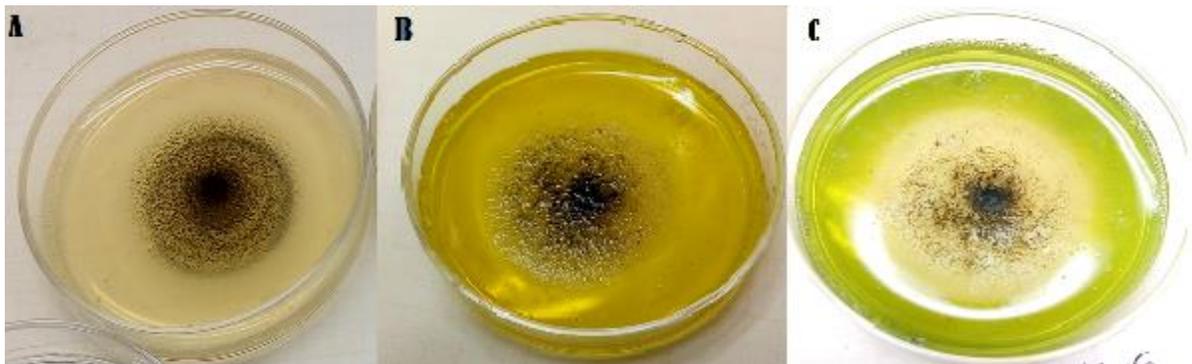


Figura 8.9 *A. niger* CBA 16-6, crecimiento radial a 3 días de incubación a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h.

En la Figura 8.10 se muestra la cepa de *A. niger* CBR 16-4, esta cepa presenta crecimiento el cual se observó 24 h después de su inoculación, al ser revelado con la solución de NH_4OH al 28% presentó halos de hidrólisis, estos resultados muestran que puede ser utilizada para la producción de extracto enzimático con actividad clorogenato hidrolasa.

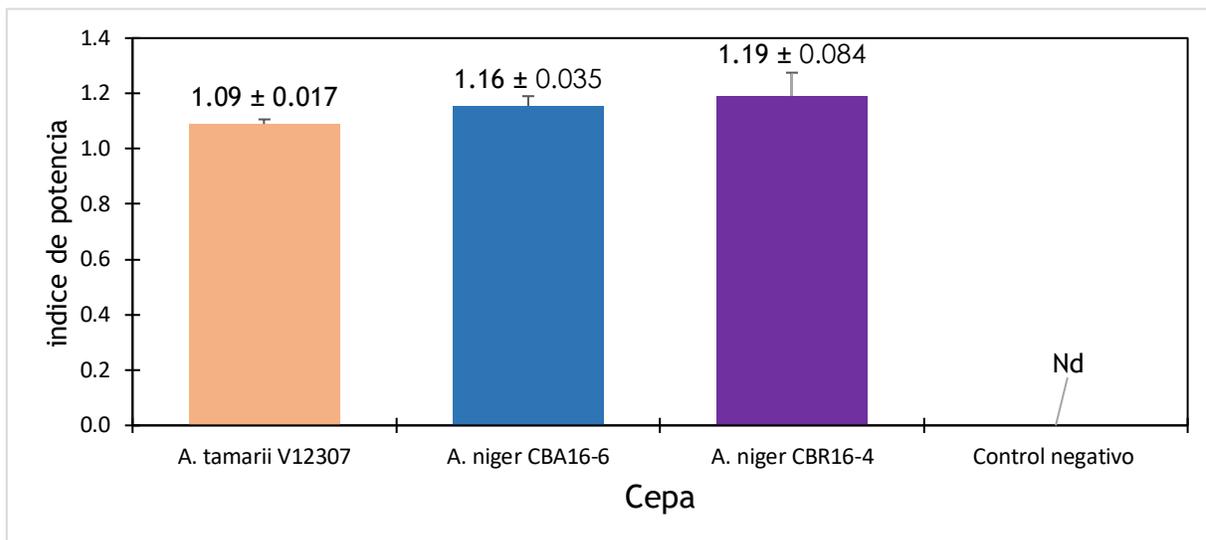


Figura 8.10 A. niger CBR 16-4 crecimiento radial a 3 días de incubación, a) Placa incubada, b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 %, c) Placa después de la adición de NH_4OH al 28 % incubada durante 2 h.

Torres-Mancera, 2013 determinó los halos de hidrólisis para cepas de *A. tamarii* y *A. niger* usando como revelador una solución de Lugol y azul de algodón. Rodríguez-Duran 2016, reporta la formación de halos de hidrólisis para cepas de *A. niger* y *A. tamarii* usando como revelador una solución de NH_4OH al 28%, esta técnica de crecimiento radial es una prueba cualitativa para evaluar la producción de enzimas con actividad CH, de este modo nos permitió evaluar las cepas a utilizar para la producción de un extracto enzimático.

Se determinó el índice de potencia revelando el halo de hidrólisis para cada una de las cepas evaluadas.

En la Figura 8.11 se presentan los valores de índice de potencia obtenido para las cepas evaluadas. El control negativo *B. bassiana* no presentó crecimiento como se esperaba ya que es un hongo entomopatógeno, y no posee la capacidad de producir enzimas clorogenato hidrolasa. La cepa *A. niger* CBR16-4 tuvo el mayor índice de potencia 1.19 sin embargo es menor al reportado por Rodríguez-Duran,2016; para cepas de *A. niger* el cual va de 1.23 a 1.31, la cepa de *A. tamarii* es el control positivo presentó un IP de 1.08 el cual es menor al reportado por Rodríguez-Duran,2016 de 1.20, esto puede deberse a la metodología utilizada.



Nd= no detectado, Control negativo= *Beauveria bassiana*, n= 5

Figura 8.11 Índice de potencia para cada cepa evaluada

CRECIMIENTO RADIAL

Se midió el crecimiento radial por 72 h para cada cepa evaluada y de esta forma se determinó la velocidad de crecimiento. La Figura 8.12 muestra el crecimiento radial para la cepa *A. niger* CBR16-4 el resto de las gráficas se encuentran (ANEXO 4),

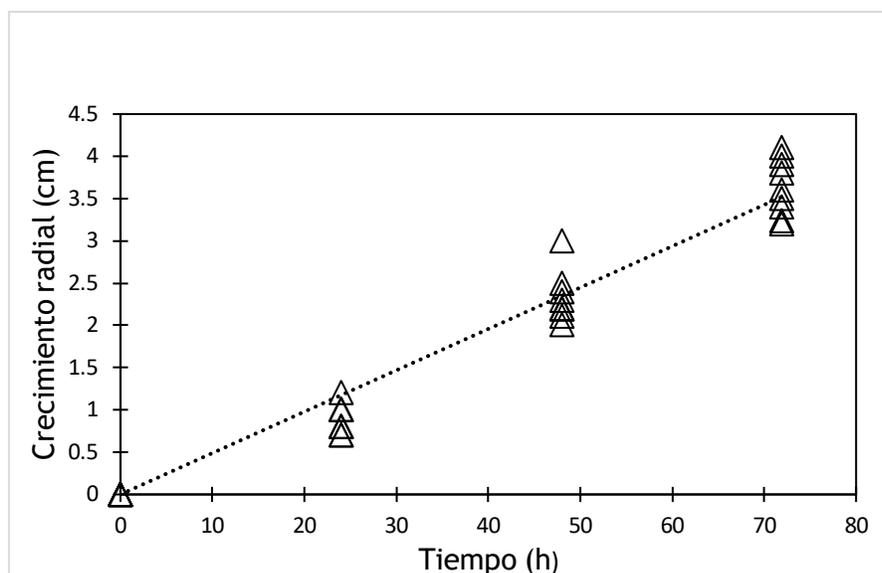


Figura 8.12 Crecimiento radial de cepas fúngicas (*A. niger* CBR16-4)

Tabla 8.2 Velocidad de crecimiento radial para las tres cepas de *Aspergillus*

| Cepa | Velocidad de crecimiento (cm/h) | Error (%) | R ² |
|--------------------------|---------------------------------|-----------|----------------|
| <i>A. tamarii</i> V12307 | 0.043 ± 0.003 | 6.98 | 0.96 |
| <i>A. niger</i> CBR16-4 | 0.049 ± 0.002 | 4.24 | 0.98 |
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | 0.044 ± 0.001 | 3.05 | 0.99 |

$$\text{error} = \frac{(\text{valor de coeficiente} - \text{valor inferior al 95 \% de confianza}) * 100}{\text{valor del coeficiente}}$$

En la Tabla 8.2 se muestra la velocidad de crecimiento, se puede observar tanto en la imagen como en la Tabla que la cepa de *A. niger* CBR 16-4 presenta la mayor velocidad de crecimiento con un valor de 0.049 cm/h este es mayor a lo reportado por otros autores.

Rodríguez-Duran (2016), reporta valores de (0.0216-0.0282 cm/h) utilizando ACL grado reactivo como fuente de carbono las diferencias se atribuyen a la diferencia de fuente de ácido clorogénico pues se utilizó extracto de café verde como fuente de ácido clorogénico.

Todas las cepas evaluadas presentan crecimiento lo que nos indica que son capaces de hidrolizar el ACL, esta información se puede utilizar para la producción de extracto enzimático con actividad clorogenato hidrolasa.

8.3 CARACTERIZACIÓN DE UNA FUENTE ALTERNATIVA DE ÁCIDO CLOROGÉNICO

El ácido clorogénico grado reactivo resulta muy caro para la realización de todos los ensayos por lo que se buscó una fuente alternativa del mismo, se utilizaron dos muestras de suplemento alimenticio con extracto de café verde (VIDANAT®) a una concentración reportada de 45 % de ACL, la muestra 1 es una muestra sólida (café verde VIDANAT®) y la muestra 2 es una muestra líquida (S&R Green coffee Bean), ambas muestras fueron analizadas por HPLC para determinar la concentración correcta.

Tabla 8.3 Concentraciones obtenidas en el análisis de fuente alternativa de ácido clorogénico

| Muestra | Concentración (%) |
|---------|-------------------|
| Sólida | 21.40 ± 0.084 |
| Líquida | 2.65 ± 0.071 |

Las fuentes alternativas comerciales de ACL tanto sólida como líquida reportan una concentración de ACL de 45 % en la etiqueta. En la Tabla 8.3 se observa que en la muestra

sólida se tiene alrededor del 21.40% lo que corresponde al 47 % de lo reportado en la etiqueta. En la muestra líquida se encontró alrededor del 2.65 % lo que corresponde al 5.9 % de lo reportado en la etiqueta. Con estos resultados se decidió utilizar la muestra sólida como fuente alternativa de ACL ajustando la concentración para tener la proporción de ACL deseada.

8.4 CARACTERIZACIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ

8.4.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS SOLUBLES E INSOLUBLES

8.4.1.1 PULPA DE CAFÉ CHIAPAS

La Tabla 8.4 se reporta el contenido de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos extraídos y cuantificados en pulpa de café proveniente del estado de Chiapas. Se puede observar la concentración de ACL tanto en la extracción metanólica la cual contiene todos los compuestos libres, como la hidrólisis alcalina en la que se extraen todos los compuestos esterificados.

Tabla 8.4 Cuantificación de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos en muestras de pulpa de café proveniente del estado de Chiapas

| Compuesto | Extracción Metanólica (mg/g MS) | Hidrolisis alcalina (mg/ g MS) | Ácidos fenólicos totales * (%) | Total (mg/g MS) |
|--------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| Ácido clorogénico | 4.19 ± 0.0072 | 0.95 ± 0.75 | 84.18 | 5.14 ± 0.082 |
| Ácido cafeico | Nd | 0.65 ± 0.23 | 10.15 | 0.65 ± 0.23 |
| Ácido ferúlico | 0.146 ± 0.003 | 0.056 ± 0.014 | 3.31 | 0.202 ± 0.017 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 0.082 ± 0.002 | 0.032 ± 0.0001 | 2.29 | 0.114 ± 0.002 |

Nd= no detectado, * Ácidos fenólicos totales extraídos y cuantificados

8.4.1.2 PULPA DE CAFÉ PP4

En las Tabla 8.5 se reporta el contenido de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos extraídos y cuantificados en la pulpa de café proveniente de la planta piloto 4. En general la extracción metanólica contiene la concentración de compuestos más alta en comparación con la hidrólisis alcalina, la cual contiene los ácidos fenólicos esterificados, esto es diferente a lo reportado por Torres-Mancera, 2013, quien encuentra una mayor concentración de AHs en la hidrólisis alcalina.

Tabla 8.5 Cuantificación de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos en muestras de pulpa de café proveniente de PP4

| Compuesto | Extracción Metanólica (mg/g MS) | Hidrólisis alcalina (mg/ g MS) | Ácidos fenólicos totales *(%) | Total (mg/g MS) |
|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Ácido clorogénico | 2.1 ±0.032 | 1.0 ±0.01 | 78.9 | 3.1 ± 0.04 |
| Ácido cafeico | Nd | 0.6 ± 0.009 | 15.0 | 0.6 ± 0.009 |
| Ácido ferúlico | 0.09 ± 0.03 | 0.01 ± 0.002 | 2.9 | 0.1 ± 0.009 |
| Ácido <i>p</i> - cumàrico | 0.08 ± 0.004 | 0.03 ± 0.005 | 2.6 | 0.1±0.0009 |

Nd= no detectado, * Ácidos fenólicos totales extraídos y cuantificados

El ACL es el componente más abundante presente en la PC, la cantidad de ACL encontrada en la extracción metanólica es de 2-4 mg /g MS, la cual está dentro de lo reportado por autores como Ramírez-Martínez, 1988; Clifford y Ramírez-Martínez, 1991; Labat *et al.*, 2000; Torres- Mancera, 2013; Rodríguez-Duran, 2016, ellos reportan valores que van de los 1.31 – 24. 42 mg /g MS y representa entre el 92-94 % de los ácidos fenólicos cuantificados en esta fracción, dentro de esta extracción se encontraron componentes como AF y Ap-C en concentraciones menores que varían de 0.076 a 0.146 mg/ g MS y 0.076 a 0.082 mg/g Ms respectivamente.

En la hidrólisis alcalina se obtuvo una concentración de ACL menor a la reportada en la extracción metanólica, con una concentración de 0.95 a 1.04 mg /g MS, representando el 56 % de los ácidos fenólicos cuantificados en esta fracción, seguido por AC con una concentración de 0.62 a 0.65 mg /g MS representando del 37 al 39 % de los compuestos totales cuantificados, y en menor concentración se encuentra el AF y el Ap-C con valores de 0.014-0.056 mg/g Ms y 0.025 – 0.032 mg/g MS respectivamente; estos valores son similares a los encontrados por Rodríguez-Duran, 2016 con valores que varían de 0.016 a 0.52 mg/g MS y son menores a los reportados por autores como Torres-Mancera *et. al*, 2011; Pérez-Morales *et. al*, 2011, que van de 0.079-0.113 mg /g MS. Las diferencias se pueden explicar por el origen diferente de las muestras y por las diferentes metodologías aplicadas.

8.5 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

8. 5.1 PULPA DE CAFÉ

La FMS se llevó a cabo durante 60 h para *A. niger* CBR 16-4 y hasta 72 h para *A. niger* CBA 16-6 esto se decidió por un ensayo preliminar en el que se determinó el tiempo de crecimiento. El crecimiento se estimó directamente por respirometría, la producción de CO₂ se modeló utilizando el método logístico (Ecuación 8.1) (Torres-Mancera, 2013; Rodríguez-Duran, 2016).

Ecuación 8.1

$$CO_2 = \frac{CO_{2max}}{1 + \left(\frac{CO_{2max}}{CO_{20}} - 1\right) * \exp(-\mu_{CO_2} \cdot t)}$$

Donde:

CO_2 = Producción total de CO_2

μ_{CO_2} = Tasa específica de producción de CO_2

$\text{CO}_{2 \text{ max}}$ = Máxima producción de CO_2

La Figura 8.13 muestra la tasa de producción de CO_2 para *A. niger* CBA16-6, para ambas condiciones, para la condición PC sin glucosa se observa una tasa de producción máxima de CO_2 de 3.70 a 4.04 $\text{mg CO}_2/\text{h g MS}$, a un tiempo de 38.4-42.4 h, para la condición PC con glucosa tenemos una tasa de producción máxima de CO_2 de 4.94-5.51 $\text{mg CO}_2/\text{h g MS}$, a un tiempo de 34.46 -43.67 h.

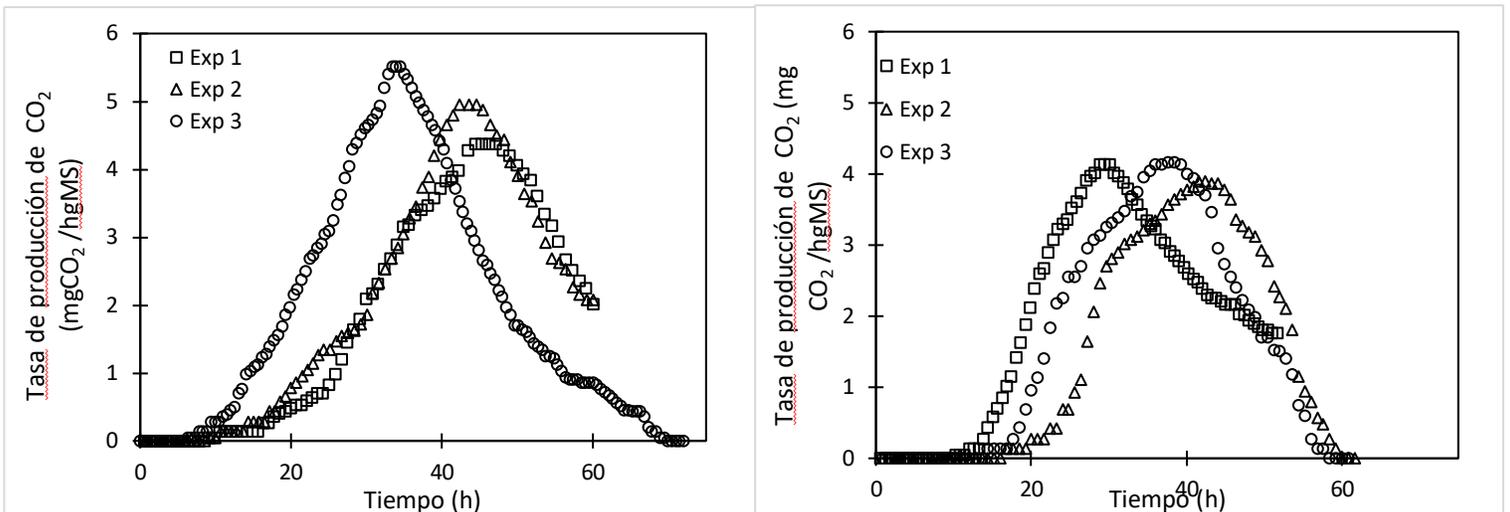


Figura 8.13 A) Tasa de producción de CO_2 en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Tasa de producción de CO_2 en pulpa de café sin glucosa, para *A. niger* CBA 16-6.

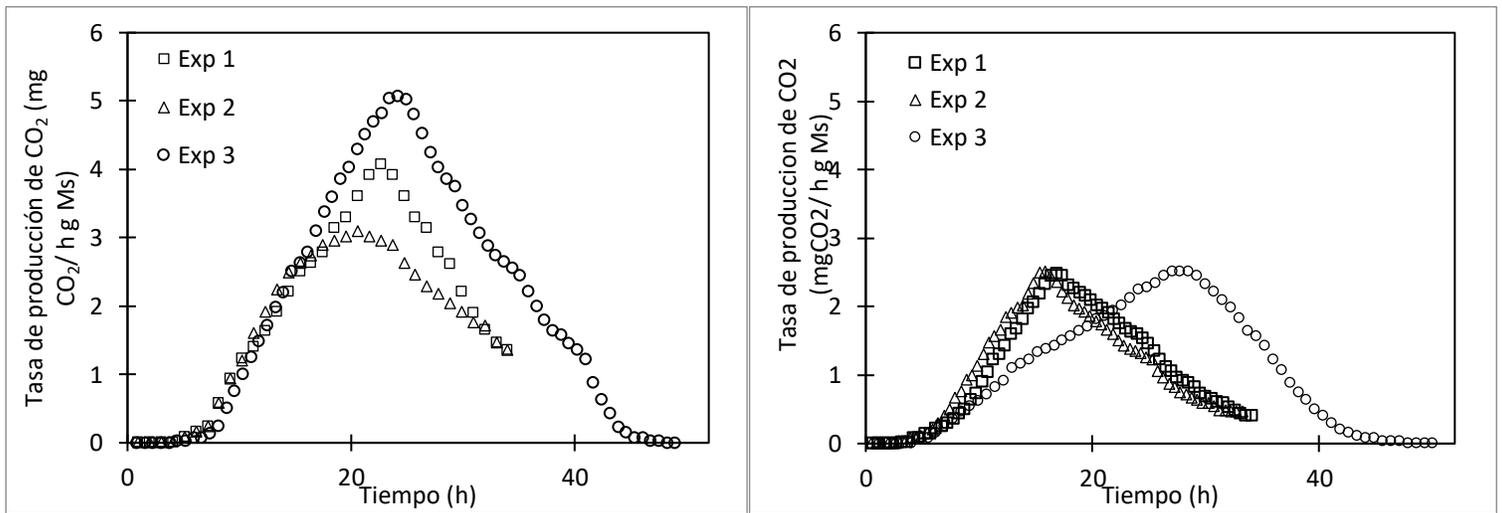


Figura 8.14 A) Tasa de producción de CO₂ en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Tasa de producción de CO₂ en pulpa de café sin glucosa para *A. niger* CBR16-4.

La Figura 8.14 muestra la tasa de producción de CO₂ para *A. niger* CBR 16-4, para la condición PC sin glucosa se observa una tasa de producción máxima de CO₂ de 2.45-2.51 mg CO₂/h g MS, a un tiempo de 16.31 a 27.7 h. Para la condición PC con glucosa tenemos una tasa de producción máxima de CO₂ de 3.09-5.03 mg CO₂/h g MS, a un tiempo de 20.63-24.9 h.

Los datos obtenidos permiten caracterizar el crecimiento de las cepas estudiadas, se observa que la cepa *A. niger* CBA 16-6 tiene una mayor tasa de producción de CO₂ para la condición PC con glucosa esto puede deberse a la mayor disponibilidad del sustrato, en comparación con la condicione PC sin glucosa que muestra valores más bajos

Las Figuras 8.15 y 8.16 muestran la producción total de CO₂ para *A. niger* CBA 16-6 y *A. niger* CBR16-4 respectivamente para las dos condiciones estudiadas, los datos obtenidos se representan con diferentes símbolos y las líneas continuas representan el ajuste del modelo

logístico, la mayor producción de CO₂ experimental es para *A. niger* CBA16-6 en la condición con pulpa de café con glucosa con un valor de 138.3 ± 0.95 mg/g MS. La menor producción de CO₂ es para *A. niger* CBR16-4 en la condición con pulpa de café sin glucosa, con un valor de 36.84 ± 0.78 mg /g MS.

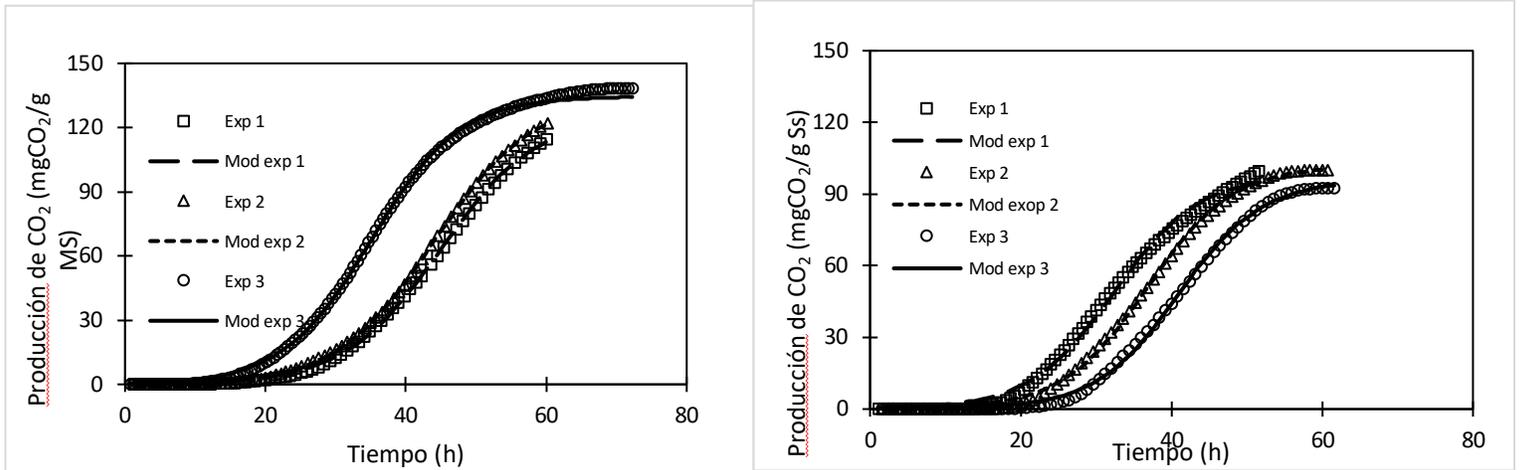


Figura 8.15 A) Producción de CO₂ en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Producción de CO₂ en pulpa de café sin glucosa para *A. niger* CBA 16-6

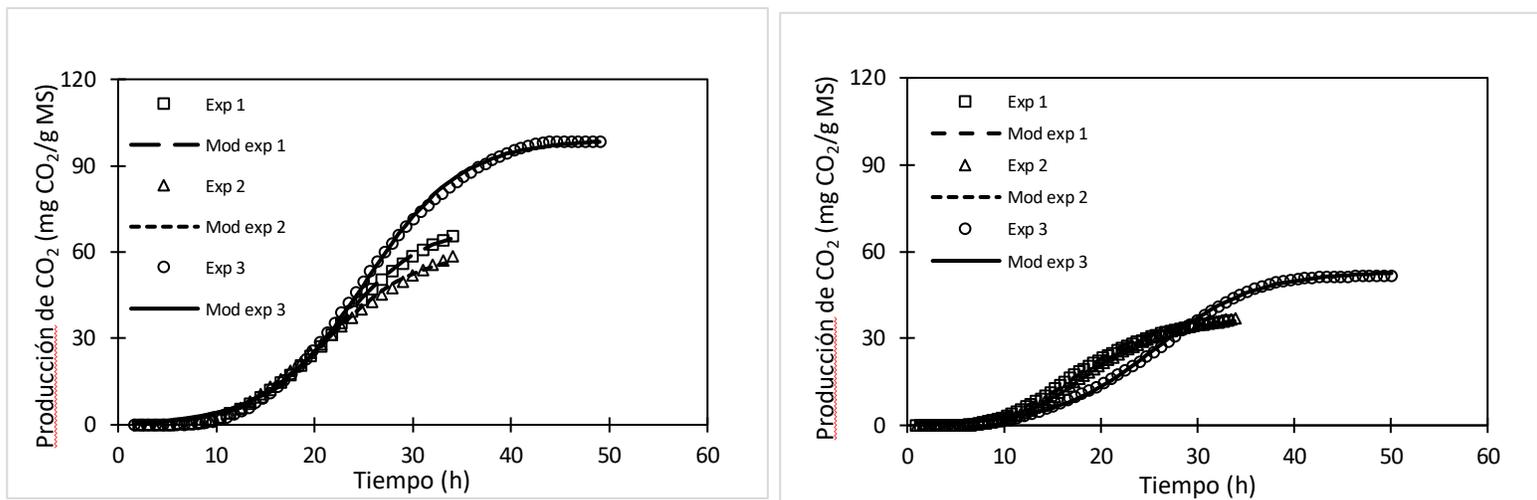


Figura 8.16 A) Producción de CO₂ en pulpa de café adicionada con glucosa, B) Producción de CO₂ en pulpa de café sin glucosa para *A. niger* CBR16-4

La Tabla 8.6 muestra los valores cinéticos obtenidos con el modelo logístico, se observa buen ajuste con valores de R^2 mayores a 0.99, los valores estimados de CO_2 máx son muy cercanos a los valores experimentales, para *A. niger* CBA16-6 se obtuvieron valores de 129.30-133.90 mg/ g MS. La constante específica de producción de CO_2 (μ_{CO_2}) mayor es para *A. niger* CBR 16-4 con un valor de $0.56 \pm 0.006 h^{-1}$ y el valor menor es para *A. niger* CBA 16-6 con $0.15 \pm 0.065 h^{-1}$. Se observa que para ambas cepas las condiciones con glucosa tienen un mayor crecimiento esto se explica por la mayor disponibilidad de sustrato en el medio.

Tabla 8.6 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio sólido con pulpa de café

| Microorganismo | Condición | μ_{CO_2} (h^{-1}) ^a | CO_2 Max (mg/ g MS) _a | T d CO_2 Max (h) ^a | CO_2 Max (mg/ h g MS) | T d CO_2 Max (h) | R^2 ^a |
|-----------------------------|------------------------------|---|--|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------|
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | Pulpa de café sin glucosa | 0.3±0.02 | 99.9 ± 1.5 | 51.9 ± 0.1 | 4.0±0.2 | 38.4 ± 0.1 | 0.99 ± 0.002 |
| | | 0.2±0.07 | 98.8 ± 4.3 | 60.4 ± 0.6 | 3.7 ± 0.3 | 42.4 ± 0.6 | 0.99 ± 0.001 |
| | Pulpa de café con glucosa | 0.20±0.03 | 129.7±4.9 | 60.1 ± 0.1 | 5.5 ± 0.2 | 34.5±0.1 | 0.99±0.0001 |
| | | 0.4±0.02 | 133.9±1.0 | 72.2± 0.1 | 4.9 ± 0.3 | 43.6 ± 0.1 | 0.99 ± 0.003 |
| <i>A. niger</i> CBR 16-4 | Pulpa de café sin glucosa | 0.2 ± 0.04 | 36.1 ± 0.8 | 33.7±0.6 | 2.5±0.3 | 16.3 ±0.1 | 0.99±0.0004 |
| | | 0.4 ± 0.01 | 52.7 ± 0.5 | 50.1±0.5 | 2.5±0.2 | 27.7 ± 0.3 | 0.99 ± 0.007 |
| | Pulpa de café con glucosa | 0.4 ±0.1 | 64.4 ± 6.7 | 34.1±0.001 | 5.0±0.6 | 24.9 ± 0.1 | 0.99 ± 0.001 |
| | | 0.6±0.01 | 98.5 ± 0.7 | 49.0 ± 0.002 | 3.0 ± 0.1 | 20.6 ±0.2 | 0.99 ± 0.006 |

^a μ_{CO_2} , CO_2 Max, T d CO_2 Max, R^2 = modelo logístico; μ_{CO_2} , tasa específica de producción de CO_2 ; CO_2 Max, producción máxima de CO_2 ; T d CO_2 Max, tiempo de producción máxima de CO_2 ; R^2 = coeficiente de determinación del modelo logístico.

Se decidió cambiar la pulpa de café por agrolita como soporte en la fermentación ya que al realizar la reacción del extracto enzimático con ACL como sustrato se encontró que no había actividad enzimática clorogenato hidrolasa, esto puede atribuirse a que en la PC se encuentran distintas fuentes de carbono. Al usar agrolita como soporte y poner un medio de cultivo definido y extracto de café verde como inductor se busca la producción de enzimas CH capaces de hidrolizar el ACL en AC y AQ.

8.5.2 CULTIVOS USANDO AGROLITA COMO SOPORTE

Se realizó un ensayo preliminar para caracterizar el cultivo y determinar el máximo valor de tasa de producción de CO₂. La Figura 9.17 muestra la tasa de producción de CO₂ para ambas cepas evaluadas, la fermentación tuvo una duración de 48 h. Se observa que el valor más alto es para *A. niger* CBR16-4 2.69 ± 0.09 (mgCO₂ /h g MS) a un tiempo de 11.8 h y el menor valor corresponde a la cepa *A. niger* CBA 16-6, con 1.47 ± 0.06 (mgCO₂ /h g MS) alcanzado a un tiempo de 16.78 h. Se puede atribuir la reducción de tiempo en comparación con el experimento anterior con pulpa de café a la utilización de un medio de cultivo definido y tiene como inductor extracto de café verde con una proporción de 22 % de ACL.

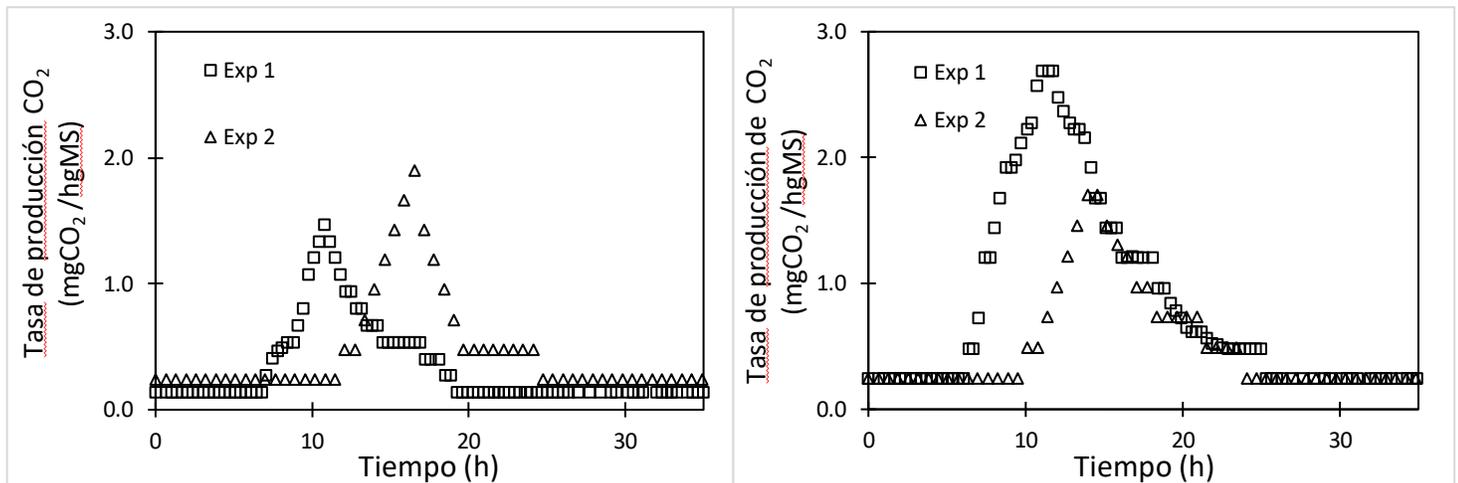


Figura 8.17 A) Tasa de producción de CO₂ para *A. niger* CBA 16-6, B) Tasa de producción de CO₂ para *A. niger* CBR16-4

La Figura 8.18 muestra la producción total de CO₂ para *A. niger* CBA 16-6 y *A. niger* CBR16-4, los datos obtenidos experimentalmente se representan con diferentes símbolos y las líneas continuas representan el ajuste del modelo logístico. La mayor producción de CO₂ corresponde a *A. niger* CBA16-4 con un valor de 21.06 ± 0.88 mg/g MS. La menor producción de CO₂ es para *A. niger* CBR16-6 con un valor de 9.77 ± 0.08 mg /g MS.

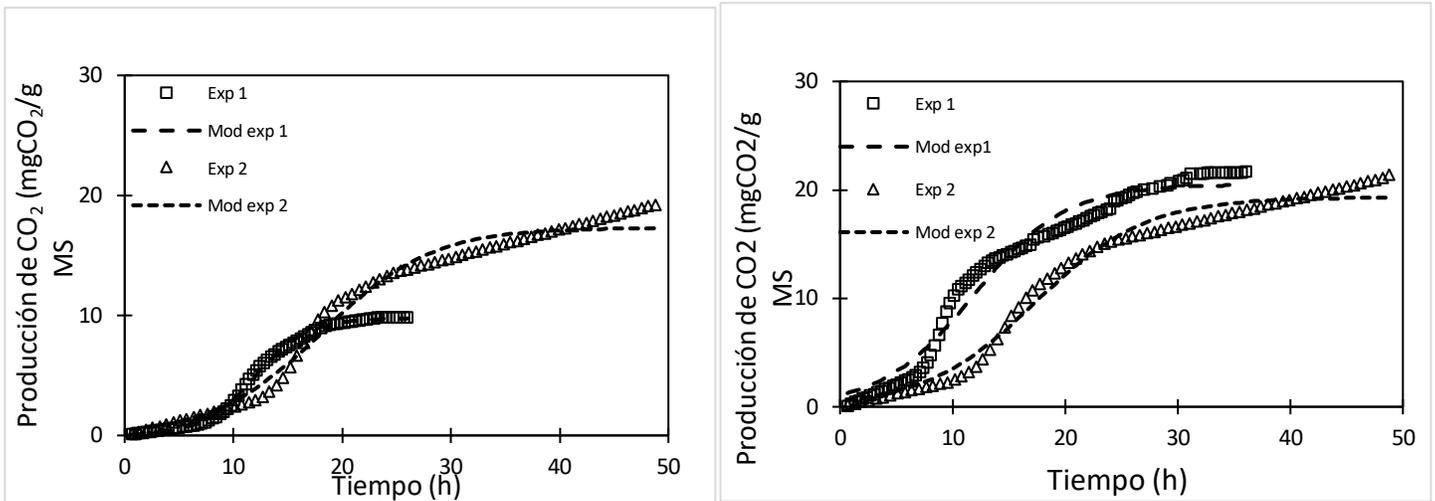


Figura 8.18 A) Producción acumulada de CO₂ para *A. niger* CBA 16-6, B) Producción acumulada de CO₂ para *A. niger* CBR 16-4

En la Tabla 8.7 se muestran los valores cinéticos obtenidos con el modelo logístico con soporte de agrolita, se observa buen ajuste con valores de R² mayores a 0.98, los valores estimados de CO₂ máx son muy cercanos a los experimentales, la constante específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) difiere para ambas cepas teniendo el mayor valor para *A. niger*

CBA16-6 con un valor de $0.41 \pm 0.008 \text{ h}^{-1}$ y el valor mínimo es para *A. niger* CBR 16-4 con un valor de $0.20 \pm 0.009 \text{ h}^{-1}$.

| Microorganismo | Tiempo de fermentación (h) | μ_{CO_2} (h^{-1}) ^a | $\text{CO}_2 \text{ Max}$ (mg/ g MS) ^a | T d $\text{CO}_2 \text{ Max}$ (h) ^a | $\text{CO}_2 \text{ Max}$ (mg/ h g MS) | T d $\text{CO}_2 \text{ Max}$ (h) | R^2 ^a |
|-----------------------------|----------------------------|--|---|--|--|-----------------------------------|---------------------------|
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | 36 | 0.4 ± 0.007 | 9.8 ± 0.008 | 36 ± 0.1 | 1.5 ± 0.06 | 16.8 ± 0.2 | 0.99 ± 0.003 |
| | 48 | 0.3 ± 0.008 | 18.2 ± 1.4 | 48.2 ± 0.5 | 2.2 ± 0.02 | 15.5 ± 0.8 | 0.99 ± 0.009 |
| <i>A. niger</i> CBR 16-4 | 36 | 0.3 ± 0.006 | 21.1 ± 0.9 | 36.1 ± 1.2 | 1.7 ± 0.03 | 13.9 ± 0.9 | 0.98 ± 0.009 |
| | 48 | 0.2 ± 0.009 | 20.4 ± 1.5 | 48.2 ± 0.9 | 2.7 ± 0.09 | 11.8 ± 0.7 | 0.98 ± 0.002 |

Tabla 8. 7 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio solido con agrolita

$a = \mu_{\text{CO}_2}$, $\text{CO}_2 \text{ Max}$, T d $\text{CO}_2 \text{ Max}$, R^2 = modelo logístico; μ_{CO_2} : tasa específica de producción de CO_2 ; $\text{CO}_2 \text{ Max}$: producción máxima de CO_2 ; T d $\text{CO}_2 \text{ Max}$: tiempo de producción máxima de CO_2 ; R^2 : coeficiente de determinación del modelo logístico.

Con base en los datos obtenidos de tasa de producción de CO_2 al tener el pico máximo de producción entre las 12 y 24 h se decidió detener el cultivo a las 12 y 24 h. La Figura 8.19 muestra la tasa de producción de CO_2 para ambas cepas evaluadas, la fermentación tuvo una duración de 24 h. El valor más alto corresponde a *A. niger* CBR16-4 2.95 ± 0.11 (mg CO_2 /h g MS) a un tiempo de 10.55 h, y el menor valor es para la cepa *A. niger* CBA 16-6, con 1.91 ± 0.32 (mg CO_2 /h g MS) a un tiempo de 11.02 h.

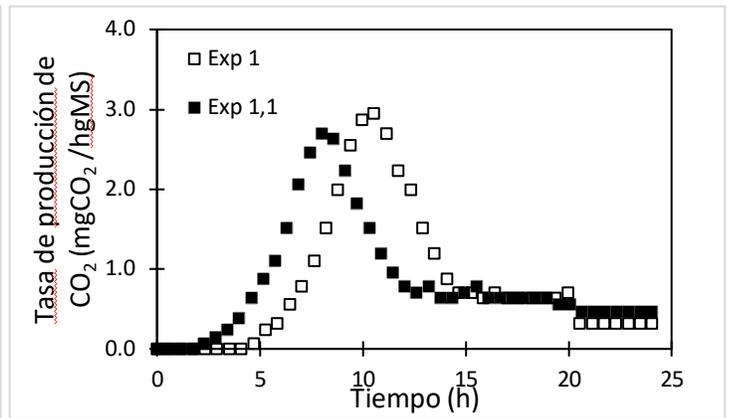
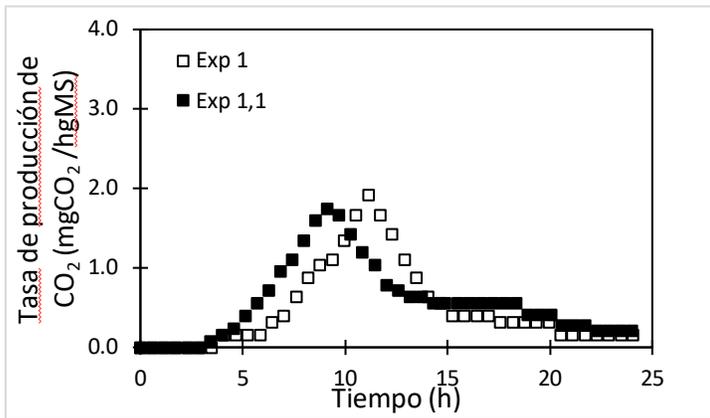


Figura 8.19 A) Tasa de producción de CO_2 para *A. niger* CBA 16-6, B) Tasa de producción de CO_2 para *A. niger* CBR 16-4

Los valores obtenidos son similares a lo reportado por Rodríguez- Duran 2016, reporta valores de tasa de producción de 1.73-2.58 $mgCO_2/h$ g MS, a un tiempo de 11.2-12.7 h.

La Figura 8.20 muestra la producción total de CO_2 para *A. niger* CBA 16-6 y *A. niger* CBR16-4, los datos experimentales se representan con diferentes símbolos y las líneas continuas representan el ajuste del modelo logístico. La mayor producción de CO_2 corresponde para *A. niger* CBA16-4 con un valor de 18.75 ± 0.11 mg/g MS. La menor producción de CO_2 experimental es para *A. niger* CBR16-6 con un valor de 12.32 ± 0.26 mg/g MS.

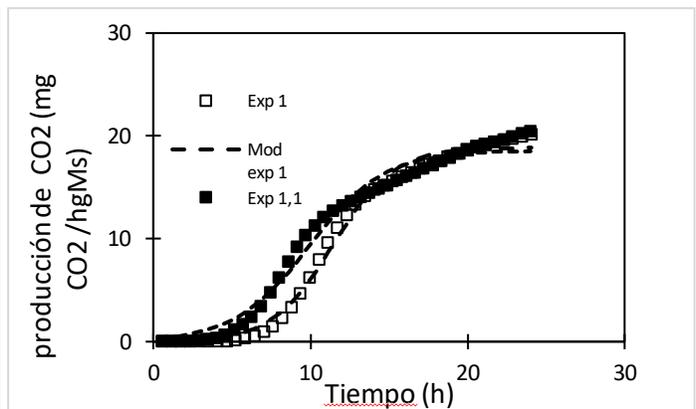
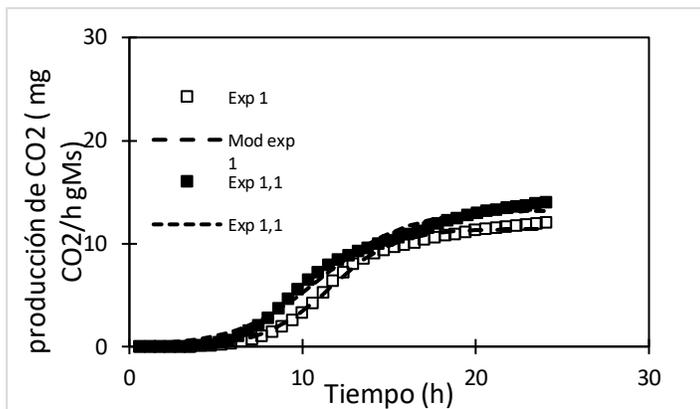


Figura 8.20 A) Producción acumulada de CO_2 para *A. niger* CBA 16-6, B) Producción acumulada de CO_2 para *A. niger* CBR 16-4

En la Tabla 8.8 se muestran los valores cinéticos obtenidos con el modelo logístico usando agrolita como soporte, se observa buen ajuste con valores de R^2 mayores a 0.98, los valores estimados de CO_2 máx son muy cercanos a experimentales, la constante específica de producción de CO_2 (μ_{CO_2}) es similar para ambas cepas para *A. niger* CBA16-6 tenemos un valor de $0.46 \pm 0.09 h^{-1}$ y para *A. niger* CBR 16-4 tenemos un valor de $0.47 \pm 0.035 h^{-1}$.

Tabla 8.8 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio solido con agrolita

| Microorganismo | Tiempo de fermentación (h) | μ_{CO_2} (h^{-1}) ^a | CO_2 Max (mg/g MS) ^a | T d CO_2 Max (h) ^a | CO_2 Max (mg/h g MS) | T d CO_2 Max (h) | R^2 ^a |
|--------------------------|----------------------------|--|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | 24 | 0.5 ± 0.1 | 12.3 ± 0.3 | 24.0 ± 0.1 | 1.9 ± 0.3 | 11.0 ± 0.26 | 0.99 ± 0.004 |
| <i>A. niger</i> CBR 16-4 | 24 | 0.5 ± 0.04 | 18.8 ± 0.1 | 24.0 ± 0.03 | 2.9 ± 0.1 | 10.6 ± 0.03 | 0.98 ± 0.003 |

$a = \mu_{CO_2}$, CO_2 Max, T d CO_2 Max, R^2 = modelo logístico; μ_{CO_2} : tasa específica de producción de CO_2 ; CO_2 Max,: producción máxima de CO_2 ; T d CO_2 Max,: tiempo de producción máxima de CO_2 ; R^2 : coeficiente de determinación del modelo logístico.

Rodríguez-Duran, (2016) reporta que *A. niger* tiene una constante específica de crecimiento (μ_{CO_2}) entre $0.43-0.56 h^{-1}$, si se comparan los valores obtenidos tenemos que las cepas analizadas entran en el rango reportado.

8.6 EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

La Figura 8.21 muestra el perfil de concentración ACL y AC para *A. niger* CBA16-6, se hicieron muestreos cada 12 horas hasta 48 horas. Podemos observar que la concentración de

ACL disminuye de la concentración inicial (0.345-0.279 $\mu\text{mol ACL/ g MS}$) esto puede ser atribuido a la hidrólisis, pues es la única fuente de carbono presente en el medio. Para el AC observamos que la concentración aumenta (0.0 a 0.17 $\mu\text{mol AC/ g MS}$) debido a la hidrólisis de ACL y después disminuye al ser consumido (0.17 a 0.13 $\mu\text{mol AC/ g MS}$).

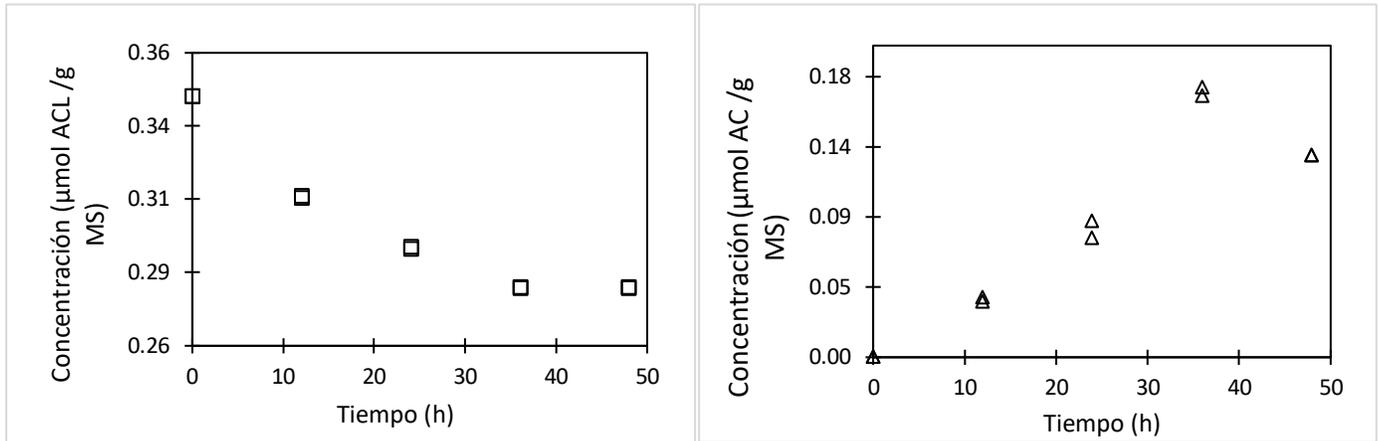


Figura 8.21 A) Concentración de ácido clorogénico, B) Concentración de ácido cafeico para *A. niger* CBA 16-6.

Figura 8.22 muestra el perfil de concentración ACL y AC para *A. niger* CBR16-4, para esto se hicieron muestreos cada 12 h hasta 48 h. Se observa que la concentración de ACL disminuye de la concentración inicial (0.40-0.27 $\mu\text{mol ACL/ g MS}$) esto puede ser atribuido a la hidrólisis, pues es la única fuente de carbono presente en el medio. Se observa que el AC aumenta de 0.0 a 0.27 $\mu\text{mol AC/ g MS}$ debido a la hidrólisis de ACL y después disminuye al ser consumido de 0.27 a 0.048 $\mu\text{mol AC/ g MS}$). Para las dos cepas se observa comportamiento similar. Se observa que la conversión de ACL a AC no muestra una conversión equimolar esto puede atribuirse a la presencia de otros ácidos cafeoil-quinicos en el extracto de café verde (Rodríguez-Duran; 2016).

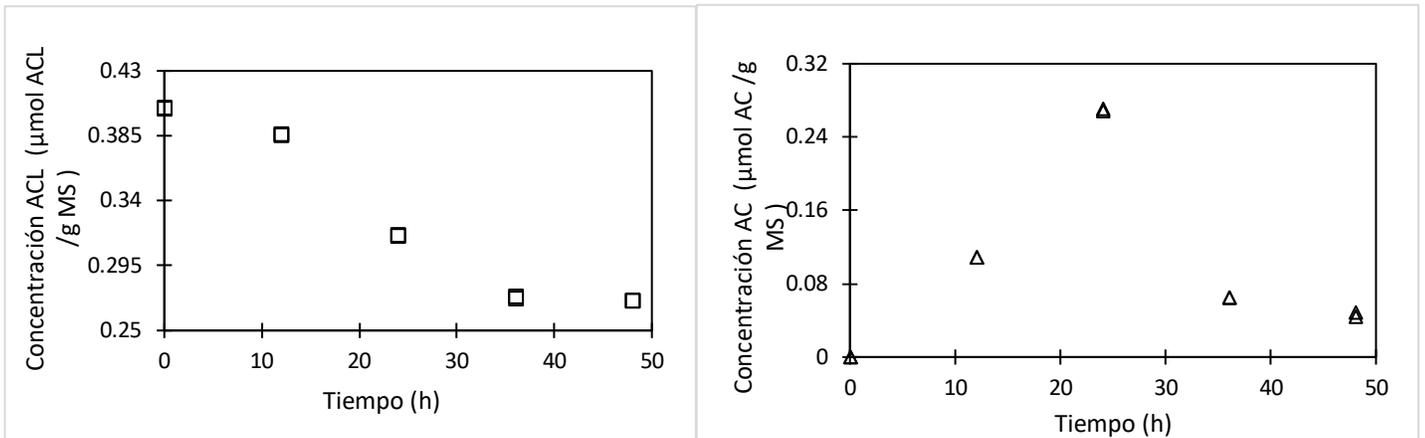


Figura 8.22 A) Concentración de ácido clorogénico, B) Concentración de ácido cafeico para *A. niger* CBR 16-4

8.7 REACCIÓN ENZIMÁTICA

En primer lugar, se evaluó la actividad enzimática del extracto enzimático producido a cada tiempo de muestreo (12-24-36 y 48 h) para determinar la concentración de ACL que se hidroliza y AC que se forma conforme avanza la fermentación y determinar el tiempo de mayor actividad enzimática.

En la Figura 8.23 se muestra el perfil de formación de AC para *A. niger* CBA 16-6 con una concentración máxima de 0.4759 (μmol AC/ g MS) para el extracto enzimático a 12 h de fermentación. El perfil de hidrólisis de ACL se encuentra en ANEXO 5, en esta grafica el comportamiento de la hidrólisis no es muy claro y se describe mejor en la gráfica de formación de AC, por lo que se decidió centrarse en ellas.

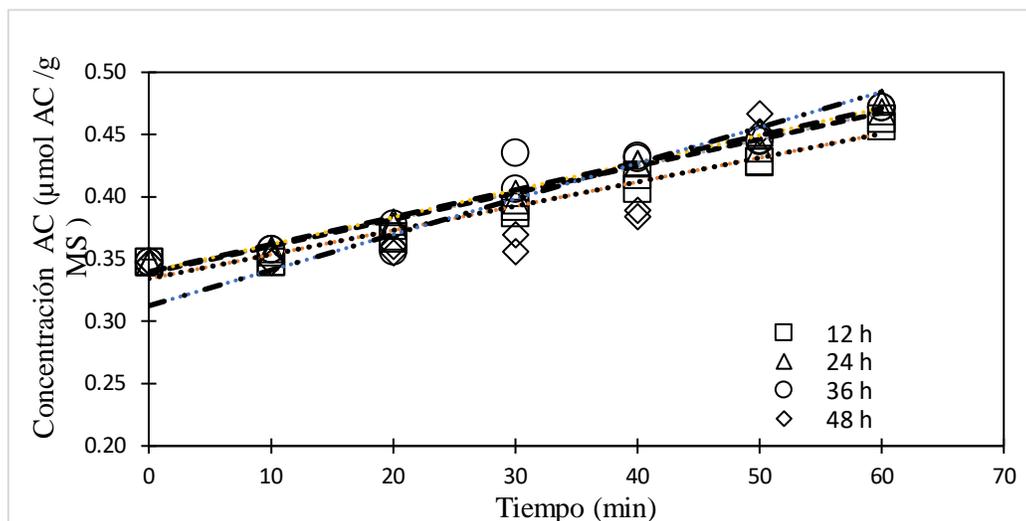


Figura 8.23 Formación de ácido cafeico para *A. niger* CBA 16-6

En la Figura 8.24 muestra el perfil de formación de AC para *A. niger* CBR 16-4 con una concentración máxima de 1.04 ($\mu\text{mol AC/g MS}$) para el extracto enzimático a 36 h de fermentación. El perfil de hidrólisis de ACL se encuentra en ANEXO 5.

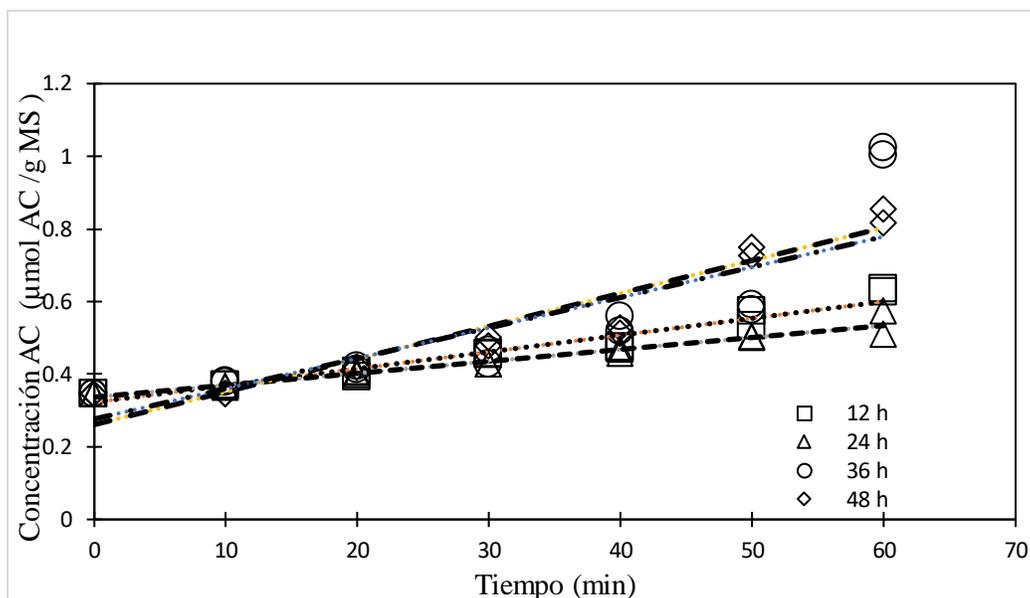


Figura 8.24 Formación de ácido cafeico para A. niger CBR 16-4

En Tabla 8.9 se muestran los parámetros de regresión lineal, para ambas cepas evaluadas teniendo los mejores ajustes con valores de R^2 arriba de 0.94 para los extractos enzimáticos producidos a 12 y 24 h para ambas cepas, con pendientes que van de 0.002-0.005 ($\mu\text{mol ACL/g MS} \cdot \text{min}$).

En base a estos resultados se decidió utilizar extracto enzimático a 12 y 24 h de cultivo, fijando el tiempo de reacción a 60 min.

Tabla 8.9 Parámetros de regresión lineal

| Cepa | Tiempo de muestreo (h) | Pendiente ($\mu\text{mol ACL/g MS} \cdot \text{min}$) | Error (%) | r^2 |
|-------------------------|------------------------|---|-----------|-------|
| <i>A. niger</i> CBR16-6 | 12 | 0.002 ± 0.0002 | 12.2 | 0.96 |
| | 24 | 0.002 ± 0.0002 | 8.0 | 0.98 |
| | 36 | 0.002 ± 0.0004 | 16.7 | 0.93 |
| | 48 | 0.003 ± 0.0009 | 33.6 | 0.77 |
| <i>A. niger</i> CBA16-4 | 12 | 0.005 ± 0.0007 | 15.1 | 0.94 |
| | 24 | 0.003 ± 0.0004 | 13.0 | 0.95 |
| | 36 | 0.009 ± 0.003 | 38.2 | 0.73 |
| | 48 | 0.008 ± 0.002 | 20.7 | 0.90 |

La Figura 8.25 muestra la hidrólisis de ACL y formación de AC para *A. niger* CBA 16-6 a un tiempo de reacción de 60 min con cada tiempo de muestreo de 0, 12, 24, 36 y 48 h, se observa que la concentración de ACL disminuye con un valor de $0.031 \mu\text{mol ACL/g MS} \cdot \text{min}$,

esto podría ser causado por el agotamiento del sustrato, de manera inversa la concentración de AC aumenta con un valor de $0.034 \mu\text{mol AC/ g MS}^* \text{ min}$, la diferencia en las concentraciones puede atribuirse a la hidrólisis de ACL, a la presencia de otros ácidos cafeoil-quinicos, así como a una posible actividad enzimática distinta (proteolítica). (Farah y Donangelo; 2006; Rodríguez-Duran; 2016)

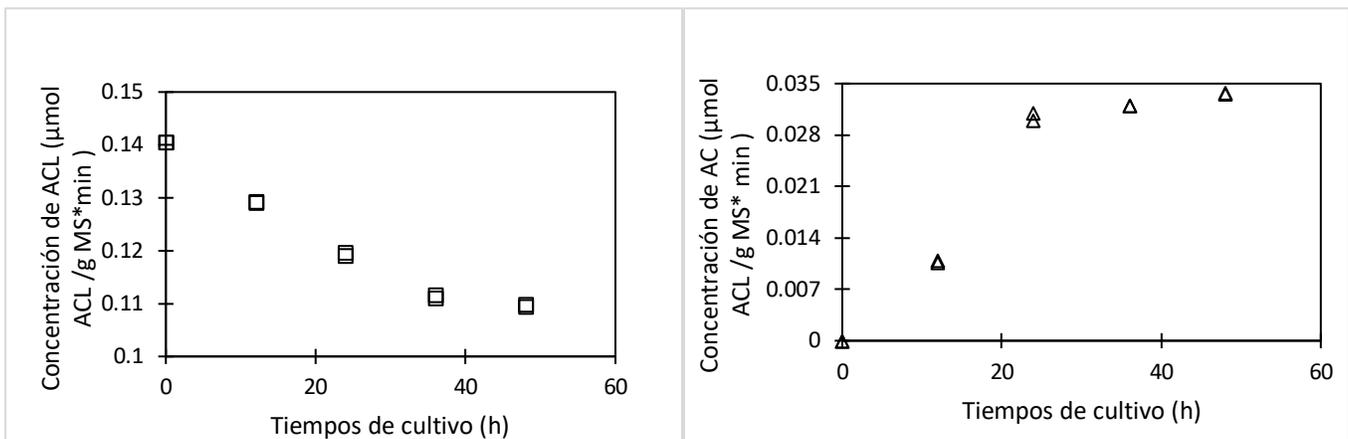


Figura 8.25 A) Hidrólisis de ácido clorogénico, B) formación de ácido cafeico para *A. niger* CBA 16-6

La Figura 8.26 muestra la hidrólisis de ACL y formación de AC para *A. niger* CBA 16-4 a un tiempo de reacción de 60 min con cada uno de 0, 12, 24, 36 y 48 h, se observa que la concentración de ACL disminuye con un valor de $0.05 \mu\text{mol ACL/ g MS}^* \text{ min}$, esto podría ser causado por el agotamiento del sustrato, de manera inversa la concentración de AC aumenta con un valor de $0.054 \mu\text{mol AC/ g MS}^* \text{ min}$, la diferencia en las concentraciones puede atribuirse a la hidrólisis de ACL, a la presencia de otros ácidos cafeoil-quinicos, así como a una posible actividad enzimática distinta (proteolítica) (Farah y Donangelo; 2006; Rodríguez-Duran; 2016).

Para ambas graficas la concentración de ACL se ajustó con los blancos (concentración de ACL con extracto enzimático y metanol a tiempo cero) y la concentración de AC se ajustó a cero ya que no fue detectada en el cromatógrafo.

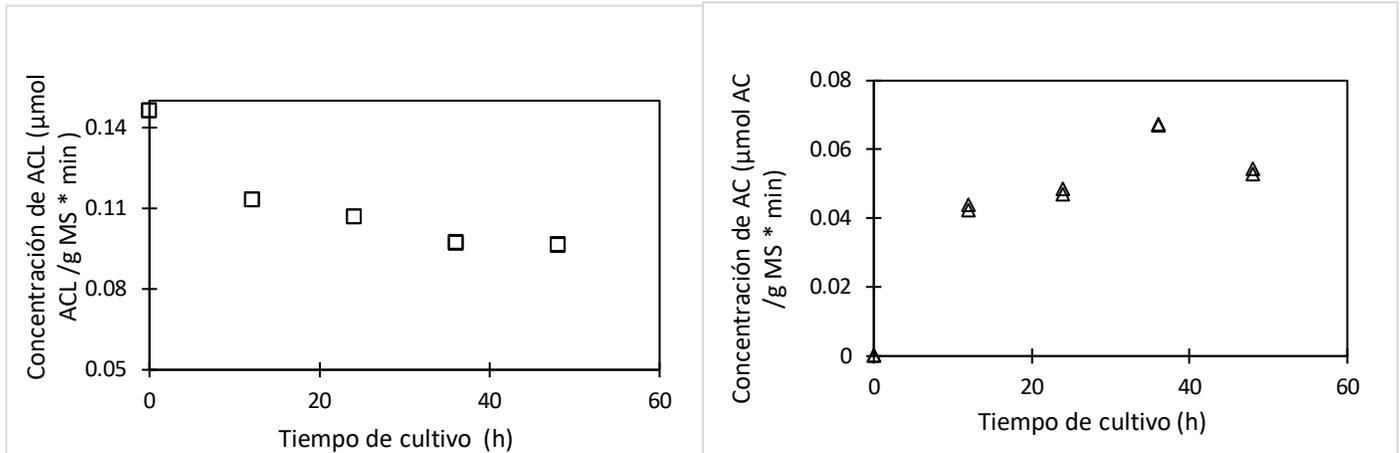


Figura 8.26 A) Hidrólisis de ácido clorogénico, B) formación de ácido cafeico para A. niger CBR 16-4.

En las Figuras 8.27 y 8.28 se describe el análisis de la actividad clorogenato hidrolasa, para ambas cepas utilizadas, se muestra el perfil de actividad enzimática cuantificada a partir del producto formado, ambas con un extracto enzimático producido a 12 y 24 horas a un tiempo de reacción de 60 min variando la concentración de sustrato de 1.10×10^{-2} – 28.22 mmol.

Se observa que los datos se adaptan al modelo de Michaelis- Menten y por medio de modelos de regresión lineal (Lineweaver-buk y Hanes-Wolf) se estimaron los parámetros enzimáticos K_m y V_{max} para cada cepa evaluada bajo las condiciones indicadas.

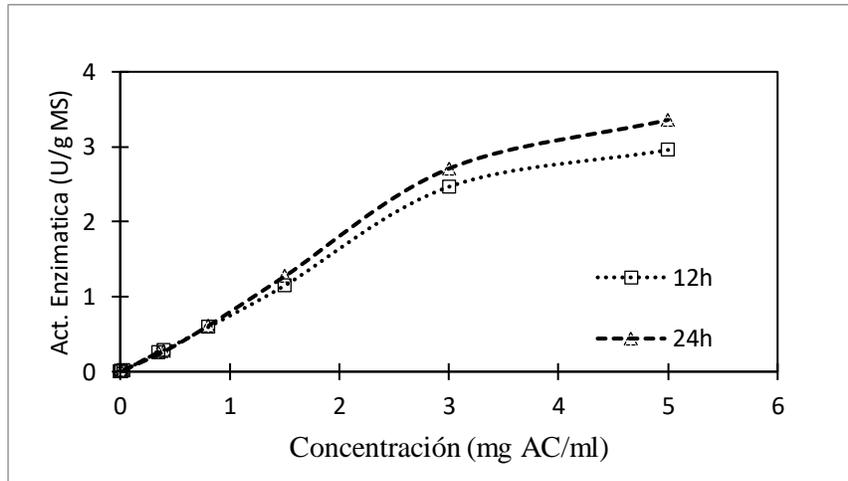


Figura 8.27 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en *A. niger* CBR 16-6

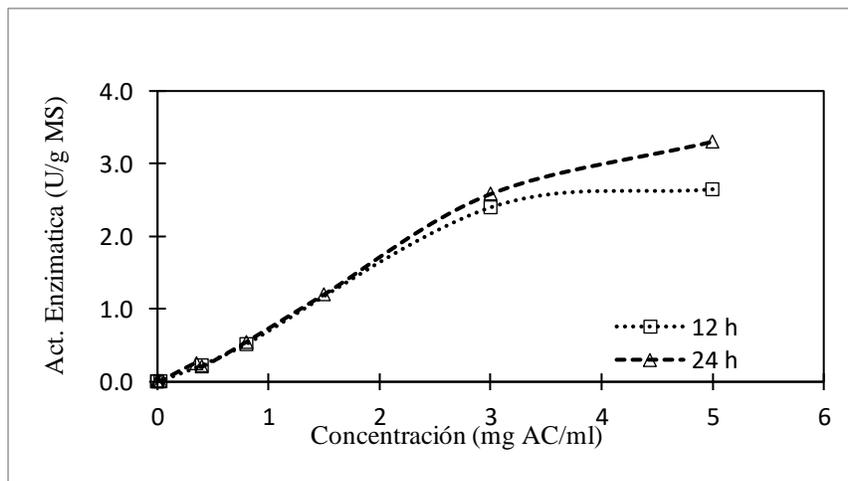


Figura 8.28 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en *A. niger* CBR 16-4.

Tomando los datos descritos en las gráficas anteriores y por medio de métodos de regresión lineal, se determinó el valor de K_m y V_{max} para cada cepa. La Figura 8.29 muestra un ejemplo de las regresiones lineales utilizadas para la caracterización de la enzima clorogenato

hidrolasa. El resto de las gráficas se encuentran en el ANEXO 6, ambos métodos tienen buenos ajustes con valores de R^2 mayores a 0.9. Se reportan valores de K_m y V_{max} del mismo orden de magnitud, para cada cepa evaluada con extracto enzimático producido a 12 y 24 h.

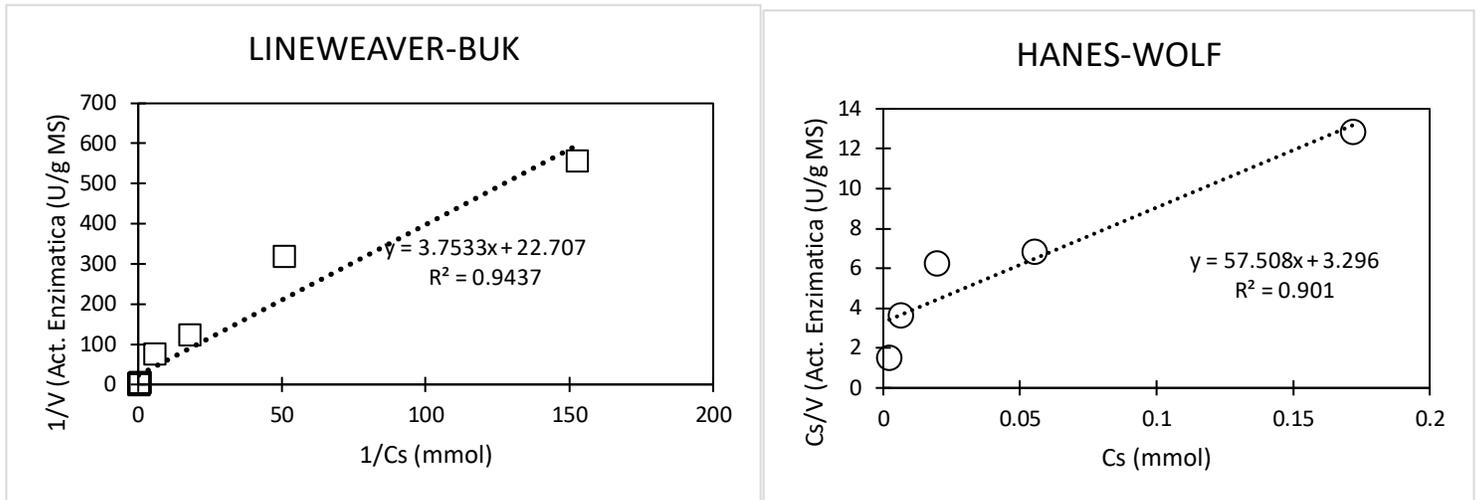


Figura 8.29 Modelos de regresión lineal para la estimación de parámetros cinéticos K_m y V_{max}

En la Tabla 8.10 se muestran los valores de K_m y V_{max} obtenidos para *A. niger* CBA 16-6, se observa un buen ajuste del modelo con R^2 mayor a 0.90. El modelo de regresión de Hanes-Wolf tiene valores más altos lo que nos dice que describe mejor los datos, se observan valores de K_m entre $1.67 \times 10^{-1} - 5.73 \times 10^{-1}$ (mmol) y valores de V_{max} entre $1.2 \times 10^{-2} - 4.4 \times 10^{-1}$ (U/g MS). Se transformaron los valores obtenidos de concentración en unidades mg/mL a mmol

En la Tabla 8.11 se muestran los valores de K_m y V_{max} obtenidos para *A. niger* CBA 16-4, en general se observa buen ajuste del modelo con R^2 arriba de 0.94, el modelo de regresión de Hanes-Wolf tiene valores más altos lo que nos dice que describe mejor los datos, se observan

valores de K_m entre $2.6 \times 10^{-2} - 1.64$ (mmol) y valores de V_{max} entre $1.74 \times 10^{-2} - 4.2 \times 10^{-2}$ (U/g MS).

Los valores de K_m de $1.1 \times 10^{-2} - 2.3 \times 10^{-1}$ (mmol) y V_{max} de 0.2 a 0.75 nkatal/g MS los valores pueden ser comparados con los que reportan autores como Asther *et al.* (2004), reporta una K_m de 0.01 mM y una V_{max} de 140 nkatal /mg, Shöbel y Pollmann, (1980) reportan una K_m de 0.70 mM, y Benoit *et. al.*, (2007) reportan valores de K_m 6 mM y V_{max} 250 nkatal /mg en una cepa genéticamente modificada. Las diferencias podrían explicarse por las diversas metodologías empleadas, pero también por la especificidad de la enzima ya que ellos utilizan extractos enzimáticos puros y el que aquí se analizó es un extracto enzimático crudo.

Tabla 8.10 Valores de K_m y V_{max} para clorogenato hidrolasa, para A. niger CBA16-6

| Compuesto | Tiempo de Extracto (h) | Método | K_m (mmol) | V_{max} (U/g Ms) | R^2 |
|-------------------|------------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|-------|
| Ácido clorogénico | 12 | L-B ^a | 2.9×10^{-2} | 1.2×10^{-2} | 0.94 |
| | | H-W ^b | 2.3×10^{-1} | 3×10^{-2} | 0.96 |
| | 24 | L-B ^a | 2.77×10^{-2} | 3.4×10^{-2} | 0.94 |
| | | H-W ^b | 1.15×10^{-1} | 2.9×10^{-2} | 0.96 |
| Ácido cafeico | 12 | L-B ^a | 1.67×10^{-1} | 4.4×10^{-2} | 0.94 |
| | | H-W ^b | 5.73×10^{-2} | 1.74×10^{-2} | 0.90 |
| | 24 | L-B ^a | 1.1×10^{-2} | 1.7×10^{-2} | 0.94 |
| | | H-W ^b | 1.1×10^{-2} | 1.74×10^{-2} | 0.90 |

^a = Lineweaver - Burk; ^b = Hanes - Wolf

*Tabla 8.11 Valores de K_m y V_{max} para clorogenato hidrolasa, para *A. niger* CBR16-4*

| Compuesto | Tiempo de Extracto (h) | Método | K_m (mmol) | V_{max} (U/g Ms) | R^2 |
|-------------------|------------------------|--------|----------------------|----------------------|-------|
| Ácido clorogénico | 12 | L-B | 1.64 | 4.2×10^{-2} | 0.97 |
| | 24 | L-B | 1.25 | 3.2×10^{-2} | 0.97 |
| Ácido cafeico | 12 | L-B | 1.5×10^{-1} | 3.4×10^{-2} | 0.95 |
| | | H-W | 5.6×10^{-2} | 1.7×10^{-2} | 0.90 |
| | 24 | L-B | 1.6×10^{-1} | 4.5×10^{-2} | 0.94 |
| | | H-W | 5.7×10^{-2} | 1.7×10^{-2} | 0.90 |

^a = Lineweaver - Burk; ^b = Hanes - Wolf

9.- CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se aplicaron técnicas para la valoración de la actividad clorogenato hidrolasa en cepas de hongos filamentosos aisladas de la pulpa de café, con lo que se obtuvo un perfil enzimático y la estimación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} para *A. niger* CBA 16-6 y CBR16-4.

Para la caracterización morfológica de cepas fúngicas, en *A. niger* CBR 16-4 y CBA 16-6 se encontró una relación L/D de 9.29 y 10.05 respectivamente, al tener relaciones L/D altas son más susceptibles a sufrir daños en sus estructuras, esto en comparación con relaciones menores *A. tamaritii* V12307 de 6.09 y *A. japonicus* AN5 de 6.42, las cuales son más resistentes al esfuerzo cortante, estos resultados podrían ser de gran relevancia para la selección del tipo de cultivo (agitado o estático). En esta sección se concluye que para estudios posteriores en FMS se recomienda la utilización de cultivos estáticos para las cepas con relación L/D mayores debido a su mayor susceptibilidad al rompimiento

Se aplicó una estrategia experimental para evaluar la actividad clorogenato hidrolasa de las cepas de manera fácil, lo que indicó que las dos cepas evaluadas son capaces de crecer en un medio con ACL como única fuente de carbono, lo que nos dice que las cepas producen la enzima capaz de realizar dicha hidrólisis. Se determinó que la cepa de *A. niger* CBR16-4 tiene una velocidad de crecimiento y un índice de potencia mayor en comparación con el resto de las cepas con índice de potencia de 1.19 y una velocidad de crecimiento de 0.049 cm/h respectivamente.

Se analizaron dos variedades de pulpa de café con el fin de caracterizarlas, se determinó que para las variedades evaluadas el ACL es el compuesto que se encuentra en mayor proporción en la fracción metanólica (92-94 %); la hidrólisis alcalina muestra que el ácido cafeico solo se encuentra en la fracción esterificada (37-39%), la concentración de ácido clorogénico y ácido cafeico varía de la variedad, origen, estado de maduración de la pulpa de café. (Torres-Mancera, 2013; Rodríguez-Duran, 2016).

Se produjo un extracto enzimático por fermentación en medio sólido, usando pulpa de café como soporte, se observan distintos perfiles de crecimiento. Para ambas cepas evaluadas la condición con pulpa de café con glucosa presenta un mayor crecimiento esto explica por la mayor disponibilidad de sustrato en el medio. Al analizar el extracto enzimático se determinó que no había actividad enzimática específica la cual fue analizada usando ACL puro como sustrato y extracto enzimático producido en la fermentación y no hubo disminución en la concentración de ACL ni formación de AC, por lo que se decidió usar agrolita como soporte y un inductor de extracto de café verde con 22 % de ácido clorogénico. Se determinó que la concentración máxima de AC producido se encuentra entre las 12 y 24 h de cultivo, después disminuye esto se atribuye al consumo, por lo que se decidió usar un extracto enzimático producido a este tiempo.

Para la reacción enzimática se utilizaron extractos producidos a 12 y 24 h con un tiempo de reacción de 60 min y una concentración de sustrato de $1.10 \times 10^{-2} - 28.22$ mmol. Usando métodos clásicos de regresión lineal se determinaron los valores de K_m y V_{max} , se obtuvieron valores de K_m de $1.1 \times 10^{-2} - 1.64$ (mmol) y V_{max} de 0.2-0.75 nkatal/g MS. Usando ACL como sustrato, los valores obtenidos son significativamente más bajos comparados con los reportados

en la literatura reportan valores de K_m 6 mM y V_{max} 250 nkatal /mg, en una cepa genéticamente modificada, tal diferencia podría explicarse por las diferencias en el ensayo, pero también por el hecho que estos autores utilizan extractos enzimáticos puros y el que aquí se analizó es un extracto enzimático crudo.

9.1 PERSPECTIVAS

1. Purificación del extracto enzimático
2. Reacciones enzimáticas con distintos sustratos para caracterización de la enzima
3. Estimación de los parámetros cinéticos
4. Desarrollar una estrategia experimental para aumentar la actividad enzimática, variando pH, temperatura, y la concentración de sustrato.
5. Desarrollar estrategias para la utilización de pulpa de café desechada en masa
6. Realizar fermentación en medio sólido a nivel reactor, tomando en cuenta la relación L/D encontrada, así como los valores de mayor producción de CO_2 y mayor actividad enzimática

10.- REFERENCIAS

- Adachi, O., Ano, Y., Akakabe, Y., Shinagawa, E. & Matsushita, K. (2008). Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 81: 143-151.
- Adams M., Ghaly A.E. (2007). Maximizing sustainability of the Costa Rica coffee industry. *J. Cleaner Prod.* Vol 15:1716-1729.

- Ancheyta J, (2017). Chemical Reaction Kinetics: Concepts, Methods and Case Studies. Instituto Mexicano del Petróleo Méxic, Wiley. 179-241.
- Andersen, M. Markham, R. (2006). Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications. CRP Taylor & Francis, New York. 397-442.
- Antier P., Minjares A.S., Roussos M., Viniegra G.G. (1993). Pectinase-hiperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25. For solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol*, Vol, 15:254-260.
- Asociación Mexicana de la Cadena Productiva del Café, A.C. (AMECAFE).
- Asther M, Estrada Alvarado M.I, Mireille Haon, David Navarro, Marcel Asther, Laurence Lesage-Meessen, Eric Record. (30 July 2004). Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Biotechnology*, Vol 115: 47-56.
- Asther, M., Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delattre, M., Lesage-Meessen, L., Labat, M. & Asther, M. (2002). Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*, Vol 38: 685-691.
- Arellano, G, M.A., Ramírez-Coronel, M.A., Torres-Mancera, M.T., Pérez-Morales, G.G. & Saucedo-Castañeda, G. (2011). Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. *Food Technology and Biotechnology*, Vol. 49: 374-378.
- Barbe, C. & Dubourdieu, D. (1998). Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 78: 471-478.
- Baqueiro P. Itzamná. (2010). Biotransformación de ácidos hidroxicinámicos por hongos del género de *Aspergillus* (tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México.
- Baqueiro P. I, Rodríguez, G, González, E, Augur A, Loera O, Saucedo G. (2010). Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Elsevier*, Vol. 101: 4721-4724.
- Barreto María. (2001). Utilización de pulpa de café como complemento en dietas para crías de tilapia *Oreochromis niloticus*. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México.

- Beltran, O. Hernandez, J. Sierra, A. Villa, S. Mecanismos de quimiopreención del ester fenético del ácido caféico (CAPE) en la iniciación de un modelo de hepatocarcinogénesis: alteración de los CYP450. Congreso nacional de química médica.
- Benoit I., Navarro D., Marnet N., Rakotomanomana N., Lesage-Meessen L., Sigoillot J. C., Asther M., Asther M. (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compound from agro-industrial by-products. *Carbohydr.* Vol. 341:1820-1827.
- Benoit Isabelle, Asther, M, Yves B, ,David Navarro,Stephane Canaan,Laurence Lesage-Meessen, Marga Herweijer,Pedro M. Coutinho, Marcel Asther,and Eric Record (Sept. 2007). Gene Overexpression and Biochemical Characterization of the Biotechnologically Relevant Chlorogenic Acid Hydrolase from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 73:, 5224-5632.
- Bonifaz, A. (2010). Microbiología médica básica. Ciudad de México. México: *Mcgraw-Hill interamericana editores, S.A. de C.V.*
- Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez, M., Serrano, L. & Viniegra, G.G. (1994). Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of Food Science and Technology*. Vol. 31: 22-26.
- Bressani, R. (1979a). The by-products of coffee berries. En: *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*, J.E. Braham, R. Bressani (Eds.), *International Development Research Centre*. Ottawa, Canadá. 5-10.
- Bressani, R. (1979b). Potential uses of coffee-berry by-products. En: *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*, J.E. Braham, R. Bressani (Eds.), *International Development Research Centre*. Ottawa, Canadá,. 17-24.
- Chaves, C. (2018). Acidos Clorogenicos presentes en el café: capacidad antimicrobiana y antioxidante. *Agronomía mesoamericana*. Vol. 30.
- CJ. Dillard. J Bruce German, Alimentos Agrícolas, Vol 80, 2000,1744-1756
- Clifford, M.N. & Ramirez-Martinez, J.R. (1991). Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry*, Vol. 40: 35-42.
- Clifford, M.N. & Ramirez-Martinez, J.R. (1991b). Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry*, Vol. 40: 191-200.

- Crepin, V.F., Faulds, C.B. & Connerton, I.F. (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 63: 647-652.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. & Clifford, M.N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. *Plant Secondary Metabolites, Blackwell Publishing*. 1-24.
- David A. Mitchell, Marin N, K. (2006). Solid-State Fermentation Bioreactors. Germany: *Springer*
- Faulds, C.B. & Williamson, G. (1993). Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17: 349-359.
- Faulds, C.B. & Williamson, G. (1994). Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology*. Vol. 140: 779-787.
- Farah, A. & Donangelo, C.M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 23-36.
- Friedman M., Jürgens H.S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* Vol 48:2101-2110.
- G. Douglas Inglis*, Juerg Enkerliy & Marks. Goettel*. (2012). Manual of techniques in invertebrate pathology. Alberta, Canada: *ELSEVIER* Ltd.
- Gerhartz Wolfgang. (1990). Enzymes in Industry Federal Republic of Germany: VCH
- Gonzalez Arellano Miguel A. (2009). Estimación de la capacidad antioxidante de ácidos hidroxicinámicos obtenidos de la pulpa de café (tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México.
- Harris L. J (1986). Modified method for fungal slide culture. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 24: 460-461.
- K. Murata, K. Yatsunami, E, fukuda, S. Onodera, O Mizukami, G. Hoshino, T. Kamei (2004), alternative medical health therapy, Vol. 10: 78-79.
- Kumar, S. & Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* 2013: 1-16.
- Kroon P.A, Garcia-Conesa M.T, Fillingham I.J, Hazlewood G.P., Williamson G. (1999). Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J. Sci. Food Agric.* Vol. 79: 428-434.

- Labat M., Augur C., Rio B., Perraud-Gaime I., Sayadi S. (2000). Biotechnological potentialities of coffee and similar with olive, two models of agroindustrial products rich in polyphenolic compounds. *Coffee Biotechnol. Qual.* 517-531.
- Lonsane, B.K. Ghildyal, N. Budiartman, S. Ramakrishna, S. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Elsevier*, Vol. 7: 258-265.
- Mateos, J.C., Rivera, M., Arrizon, J., Canales, A. & Sandoval, G. (2009). Enzymes useful in the synthesis of bioactive caffeic acid derivatives: Practical screening and structurefunction relationships. En: *New Horizons in Biotechnology*, A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol, C.-G. Dussap (Eds.), Asiatech Publishers Inc. New Delhi, India. 132-156.
- Martínez-Carrera, D., Aguilar, A., Martínez, W., Bonilla, M., Morales, P. & Sobal, M. (2000). Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. En: *Coffee Biotechnology and Quality*, T. Sera, C.R. Soccol, A. Pandey, S. Roussos (Eds.), Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, 471-488.
- Martinez-Carrera, D., Aguilar, A., Martinez, W., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. & Larque-Saavedra, A. (1998). A sustainable model for rural production of edible mushrooms in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada*, Vol. 11: 77-96.
- Mc. Sabu, R. Kuttan. (2002). Anti-diabetic activity of medicinal plants and its relationship with their antioxidant property. *Journal of Ethnopharmacol* Vol 81, 155-160.
- Molina M., Lechuga O.R., Bressani R. (1990). Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. *Agron. Meso.* Vol 1:79:82.
- Murat Kartal a, Sulhiye Yildiz b, Serdar Kayaa, Semra Kurucu a, Gülaçtı Topçu. (January 2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *Elsevier*, Vol. 86, 69-73.
- Murthy, P.S. & Naidu, M.M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. *Resources, Conservation and Recycling*, Vol. 66: 45-58
- Nava Villagómez José Isaías. (2003). Fermentación de pulpa de café con *Penicillium commune* a nivel laboratorio y semi piloto. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. Ciudad de México.

- Nava, I. Favela, E. and Saucedo, G. (2011). Effect of Mixing on the Solid-State Fermentation of Coffee Pulp with *Aspergillus tamarii*. *Food Biotechnol*, Vol. 49, 391-395.
- Nava, I. Gaime, I. Huerta, S. Favela, E. and Saucedo, G. (2006). *Penicillium commune* spore production in solid-state fermentation of coffee pulp at laboratory scale and in a helical ribbon rotating reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol, 81, 1760-1766.
- Negrel, J. Javelle, F. Morandi, D. Lucchi, G. (2016). Characterization and purification of a bacterial chlorogenic acid esterase detected during the extraction of chlorogenic acid from arbuscular mycorrhizal tomato roots. *ELSEVIER*, Vol. 109: 308-318
- Nishant Gopalan, Rodriguez-Duran, L.V. Saucedo-Castañeda, G. K. Madhavan Nampoothiri. (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzymes for biorefining of biomass. *ELSEVIER*, Vol, 193: 534-544.
- Nielsen, Jens Hoirist et al. (2011). *Bioreaction Engineering Principles*. New York: Springer.
- Okamura, S. & Watanabe, M. (1982). Purification and properties of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from *Aspergillus japonicus*. *Agricultural and Biological Chemistry*. Vol. 46: 1839-1848.
- Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D. (2000a). New developments in solid state fermentation: Ibioprocesses and products. *Process Biochem*. Vol. 35: 1153-69.
- Pandey A., Soccol C.R., Nigam P., Brand D., Mohan R., Roussos S. (2000b). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. Vol 6:153-162.
- Peñaloza W., Molina R.M., Gómez- Brenes R., Brezan R. (1985). Solid-State Fermentation and Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol, 49:388-393.
- Pérez-Morales, G.G. (2008). Producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido en pulpa de café. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

- Pérez-Morales G, Ramírez-Coronel A, Guzmán-López, O, Cruz-Sosa, F, Perraud-Gaime, I, Roussos S, & Saucedo-Castañeda, G. (2011). Feruloyl Esterase Activity from Coffee Pulp in Solid-State Fermentation. *Food Technol. Biotechnol*, Vol, 49, 352-358.
- Rajkumar Rathinavelu y Giorgio Graziosi. (2005). Posibles usos alternativos de los residuos y subproductos del café. 1 marzo 2018, de Universidad de Trieste Italia Sitio web: <http://www.ico.org/documents/ed1967c.pdf>
- Ramírez-Coronel, M.A., Torres-Mancera, M.T., Augur, C. & Saucedo-Castañeda, G. (2007). Estudio del contenido de ácidos hidroxicinámicos de la pulpa del café para su biotransformación. *Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Morelia, Michoacán, México.
- Ramírez-Coronel, M.A., Marnet, N., Kolli, V.S.K., Roussos, S., Guyot, S. & Augur, C. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Vol. 52: 1344-1349.
- Ramírez-Martínez, J.R. (1988). Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 43: 135-144.
- Ramírez-Martínez, J.R. (1999). *Pulpa de café ensilada*. Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, V
- Ramírez-Velazco L, M.A. Armendáriz-Ruiz, J. Arrizon, J.A Rodríguez- González, J.C Mateos-Díaz. (2016). Liberación de ácido cafeico de la pulpa de café empleando un extracto con actividad clorogenato hidrolasa de *Aspergillus ochraceus* producido por fermentación en medio sólido. *Revista mexicana de ingeniería química*, Vol, 15, 503-512.
- Rechner A., Spencer J., Kuhnle G., Hahn U., Evans C. (2001). Nobel biotransformations of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol, 30: 1213-1222.
- Rodríguez-Durán L. V., Ramírez-Coronel, A, Favela-Torres, E, Aguilar-González C, & Saucedo-Castañeda G. Selección de cepas fúngicas productoras de clorogenato hidrolasa. *XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, 26 – 29 de junio de 2015.

- Rodríguez-Duran L.V., †Ramírez-Coronel, A.†, Aranda-Delgado,E, K. Madhavan Nampoothiri, Favela-Torres, E, N Aguilar, C, & Saucedo-Castañeda, G. (2014). Soluble and Bound Hydroxycinnamates in Coffee Pulp (*Coffea Arabica*) from seven cultivars at Three Ripening Stages. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, Vol. 62:7869-7876.
- Rodríguez-Duran Luis V. (2016). Extracción, purificación y transformación enzimática del ácido clorogénico de la pulpa de café (tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México.
- Ruiz Sánchez Patricia (2002). Producción de cafeoil, feruloil y p-cumaroil esterases por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono (tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México.
- Sánchez-Lazcano E., Trejo-Márquez, Pascual-Bustamante S., Vargas-Martínez. (2016). Efecto del grado de tostado en granos de café de diferentes regiones productoras de México sobre el contenido de compuestos fenólicos, cafeína y la actividad antioxidante. *Investigación y Desarrollo en ciencia y tecnología de alimentos*, Vol. 1: 478-483.
- Sosa Lopez, Angela A. - Cabrera, María G. - Alvarez, Roberto E. - Verdun, Carolina E. (2000). Búsqueda de Usos Alternativos de Própolis en el Control Biológico de Hongos Fitopatógenos. *Facultad de Ciencias Agrarias*. UNNE, 2131, 340.
- Schöbel. B, W. Pollmann. (January 17, 1980). Isolation and Characterization of a Chlorogenic Acid Esterase from *Aspergillus niger*. *Z. Naturforsch*, Vol 35: 209-212.
- Suzuki López A. (1999). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas para la conservación de pulpa de café por ensilaje. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México.
- Torres Mancera M, T. (2013). Obtención de ácido clorogénico en la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido (tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Ciudad de México.
- Torres-Mancera, M.T., Baqueiro-Peña, I., Figueroa-Montero, A., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Favela-Torres, E. & Saucedo-Castañeda, G. (2013). Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnology Progress*. Vol, 29: 337-345.

- Torres-Mancera M.T, *et. al.* (2011). Enzymatic Extraction of Hydroxycinnamic Acids from Coffee Pulp. *Food Technol. Biotechnol.* Vol. 49, 369–373.
- USDA. Foreign Agricultural Service. Office of Global Analysis Online Database. Network, 06/04/2018.
- United States Department of Agriculture. (2017). Coffee:World Markets and Trade. Enero 2020, de USDA Sitio web: (<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx>)
- Valdez-Vázquez, I., Acevedo-Benitez, J.A. & Hernandez-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, Vol. 14: 2147-2153
- Van Dijk Aimée E., MSC Margreet R. Olthof, PHD, Joke C. Meeuse , MSC, Elin Seebus, MD, Rob J. Heine , MD, PHD y Rob M. van Dam , PHD . (2009). Acute Effects of Decaffeinated Coffee and the Major Coffee Components Chlorogenic Acid and Trigonelline on Glucose Tolerance. *Diabetes Care*, Vol. 32 : 1023-1025.
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Romero-Gómez, S., Díaz-Godínez, G., Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 13: 157-167.
- T. Sera, CR Soccol, A. Pandey, S. Roussos. (2000). Coffee Biotechnology and quality. Londrina Brazil: *Springer-Science Business Media*, B.V. 438.
- Waterman P.G., Mole S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh.

11.- ANEXOS

11.1 ANEXO 1. Preparación de inóculo

Colocar 200 μ l de Tween 80 en un tubo Eppendorf y se agregó inóculo con un asa de platino de manera estéril y cuantificar la concentración de la suspensión de conidios con cámara de Neubauer y se estandarizo hasta obtener una concentración de 1×10^8 conidios * ml^{-1} .

11.2 ANEXO 2. Composición de azul de lactofenol

Tabla 11.1 Elaboración de colorante azul de lactofenol

| Compuesto | Cantidad |
|-----------------|----------|
| Fenol | 0.1 g |
| Ácido láctico | 8 mL |
| Agua destilada | 10 mL |
| Glicerina | 20 mL |
| Azul de alanina | 0.5 g |

11.3 ANEXO 3 Longitud y diámetro de hifas

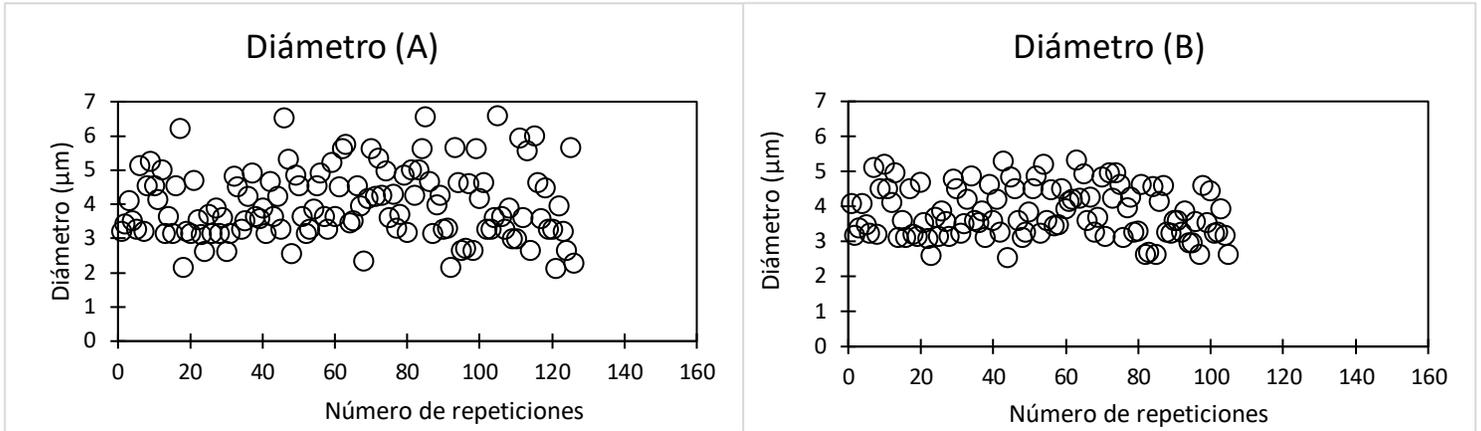


Figura 11.1 Datos de diámetro de las hifas de *A. japonicus* AN5 A) Datos originales, B) Datos corregidos

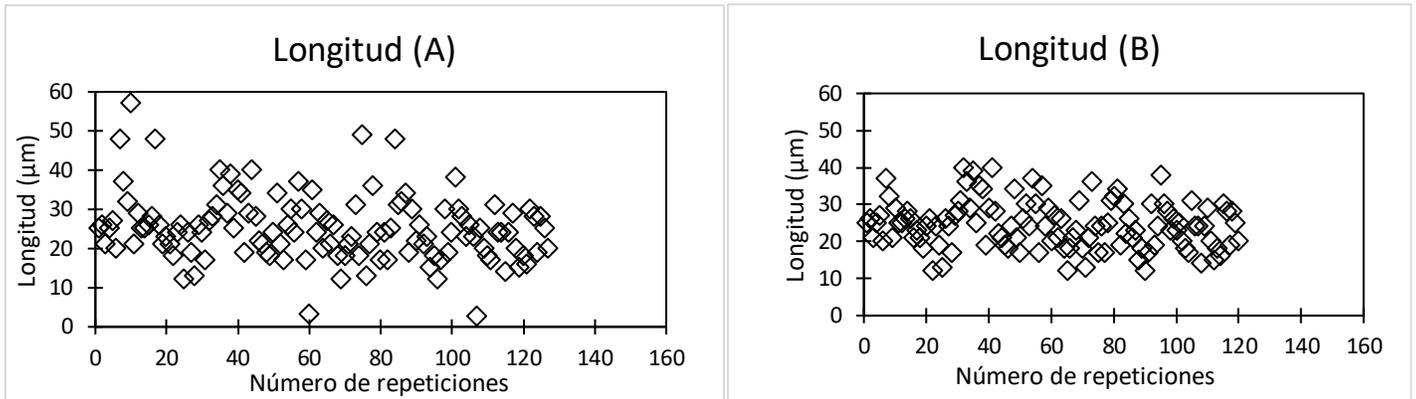


Figura 11.2 Datos de longitud de las hifas de *A. japonicus* AN5 A) Datos originales, B) Datos corregidos.

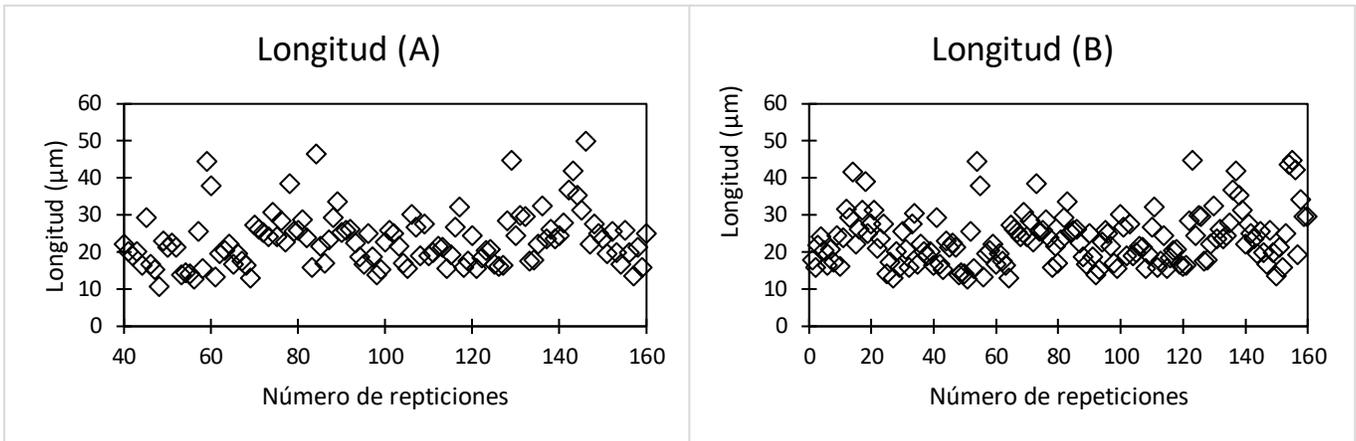


Figura 11.3 Datos de longitud de las hifas de A. tamaritii V12307 A) Datos originales, B) Datos corregidos

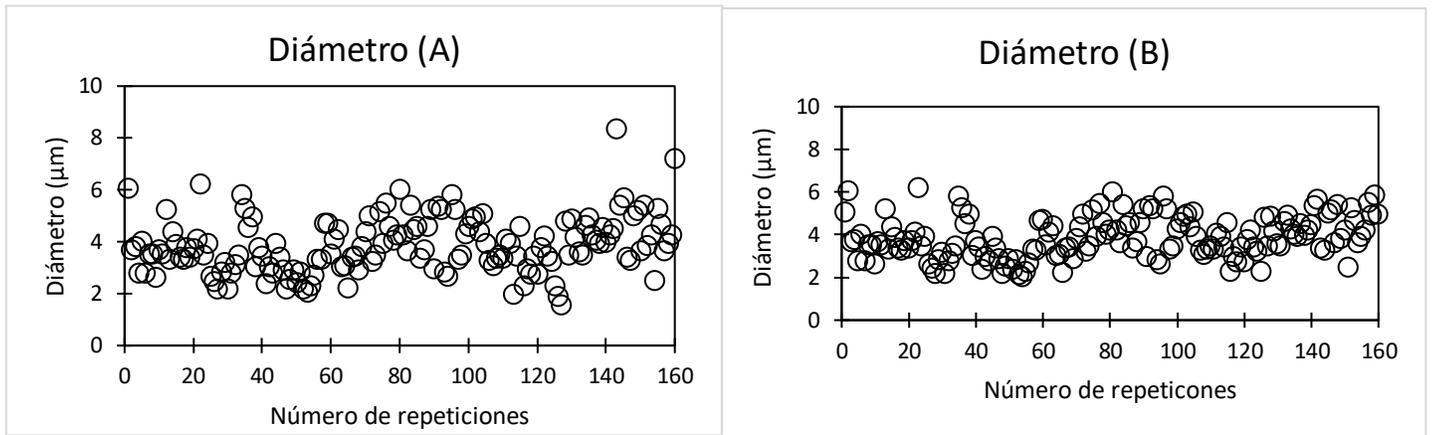


Figura 11.4 Datos de diámetro de la hifa de A. tamaritii V12307 A) Datos originales, B) Datos corregidos

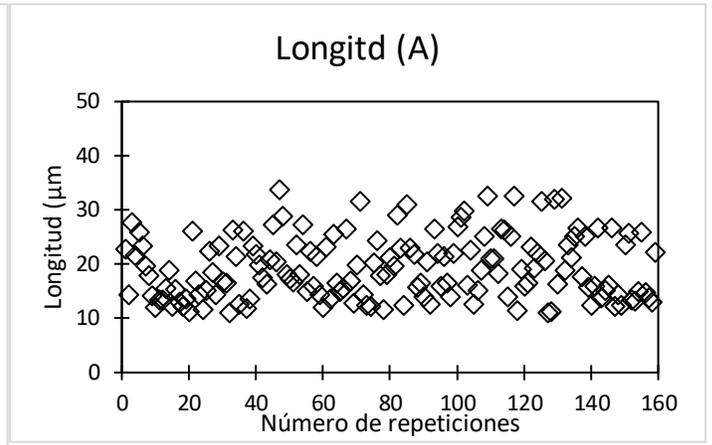
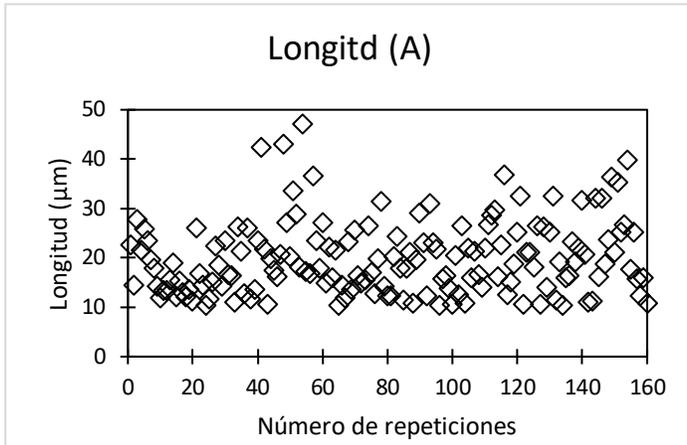


Figura 11.5 Datos de longitud de la hifa de A. oryzae 2094, A) Datos originales, B) Datos corregidos

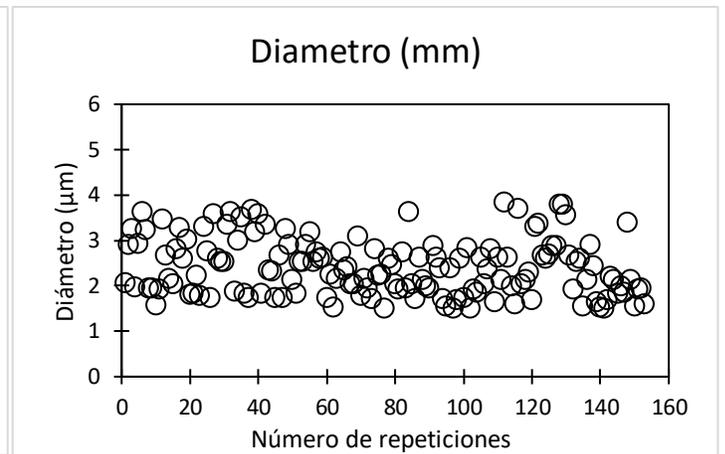
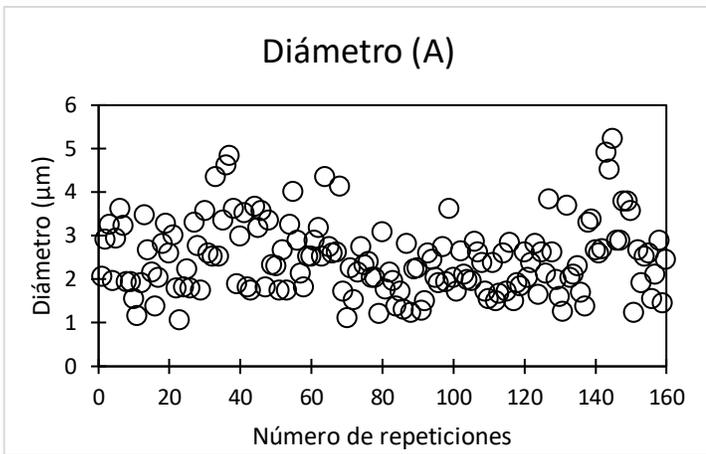


Figura 11.6 Datos de diámetro de la hifa de A. oryzae 2094, A) Datos originales, B) Datos corregidos

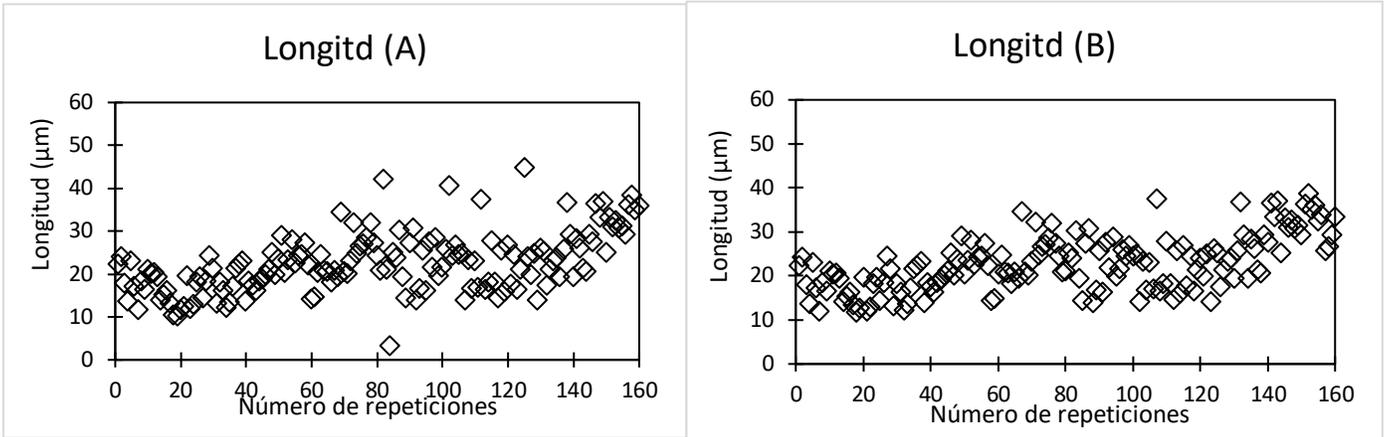


Figura 11.7 Datos de longitud de la hifa de A. niger HT4, A) Datos originales, B) Datos corregidos.

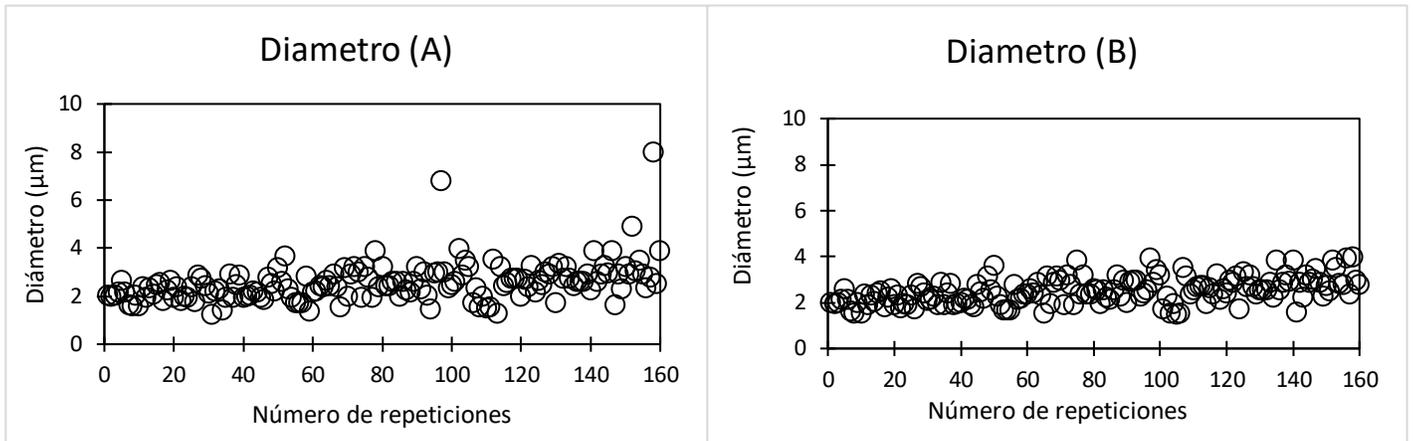


Figura 11.8 Datos de diámetro de la hifa de A. niger HT4, A) Datos originales, B) Datos corregidos.

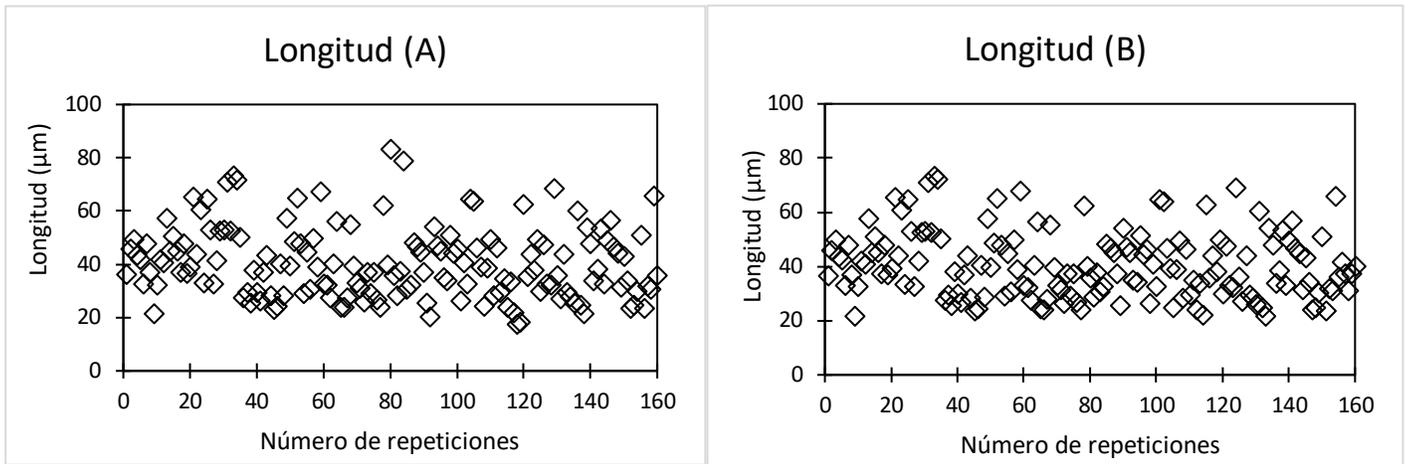


Figura 11.9 Datos de longitud de la hifa de A. niger GH1, A) Datos originales, B) Datos corregidos

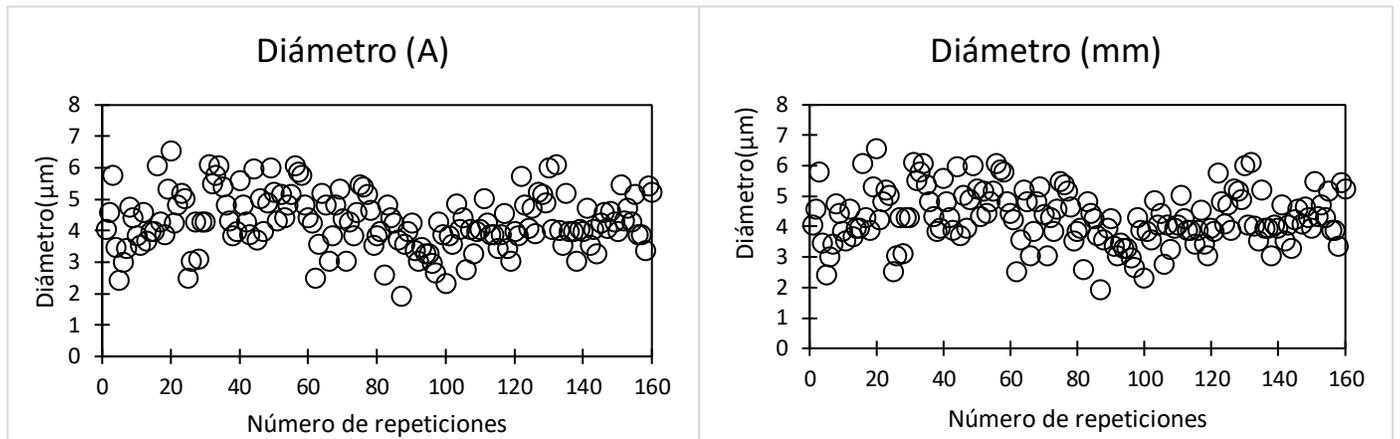


Figura 11.10 Datos de diámetro de la hifa de A. niger GH1, A) Datos originales, B) Datos corregidos

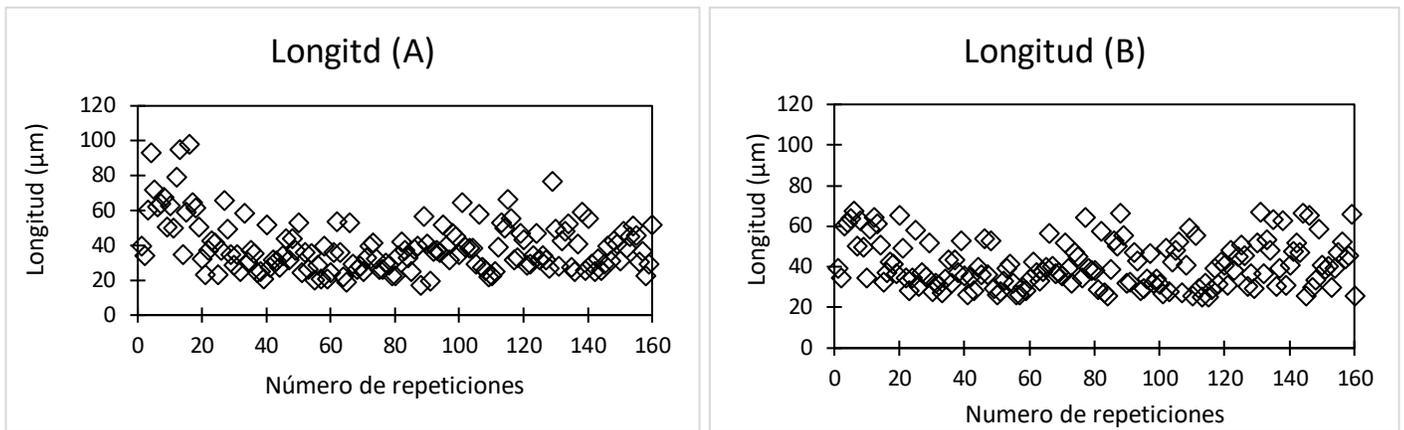


Figura 11.11 Datos de longitud de la hifa de A. niger PSH, A) Datos originales, B) Datos corregidos

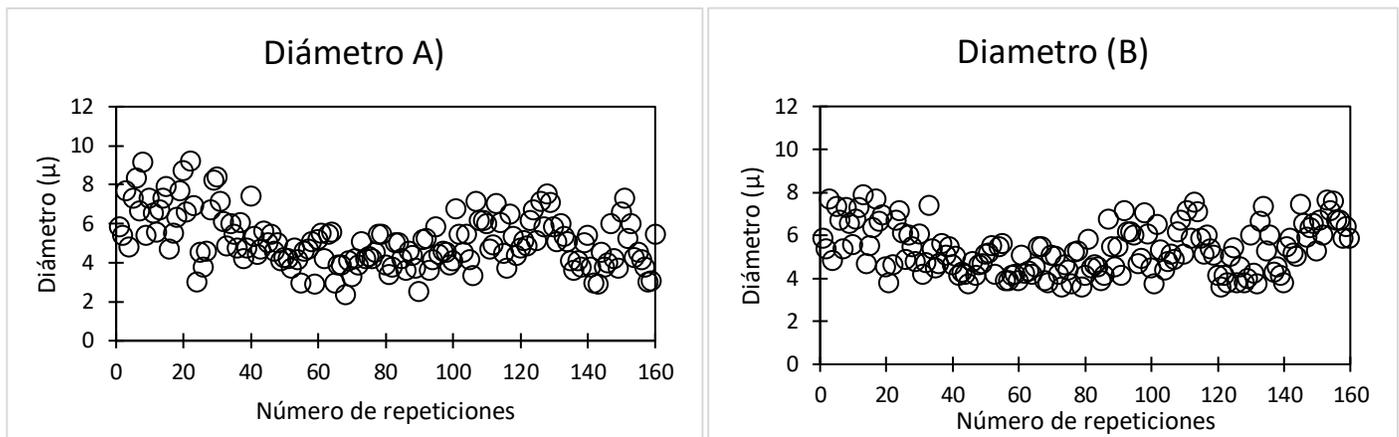


Figura 11.12 Datos de diámetro de la hifa de A. niger PSH, A) Datos originales, B) Datos corregidos

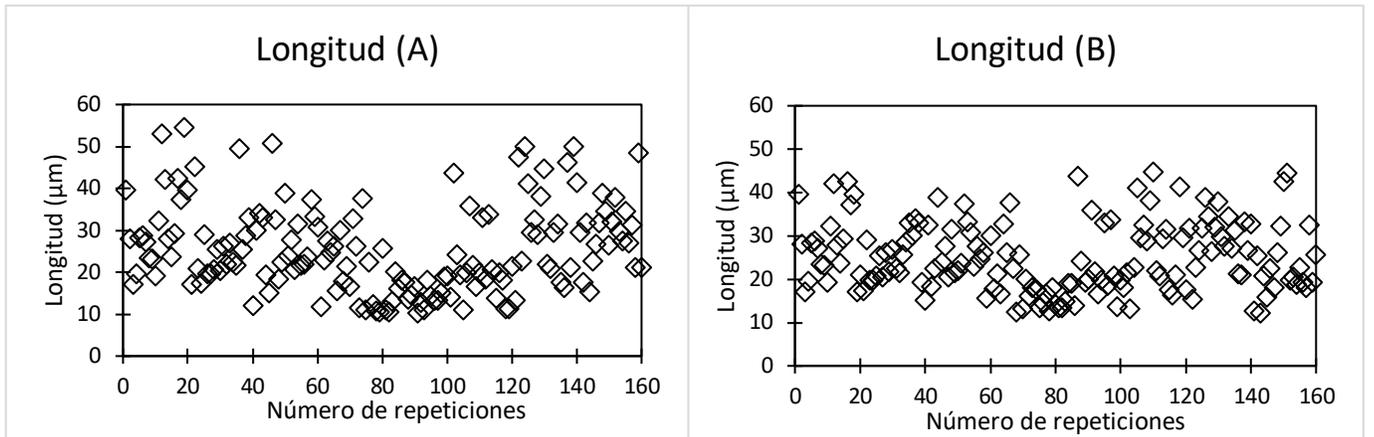


Figura 11.13 Datos de longitud de la hifa de A. niger CBA 16-6, A) Datos originales, B) Datos corregidos

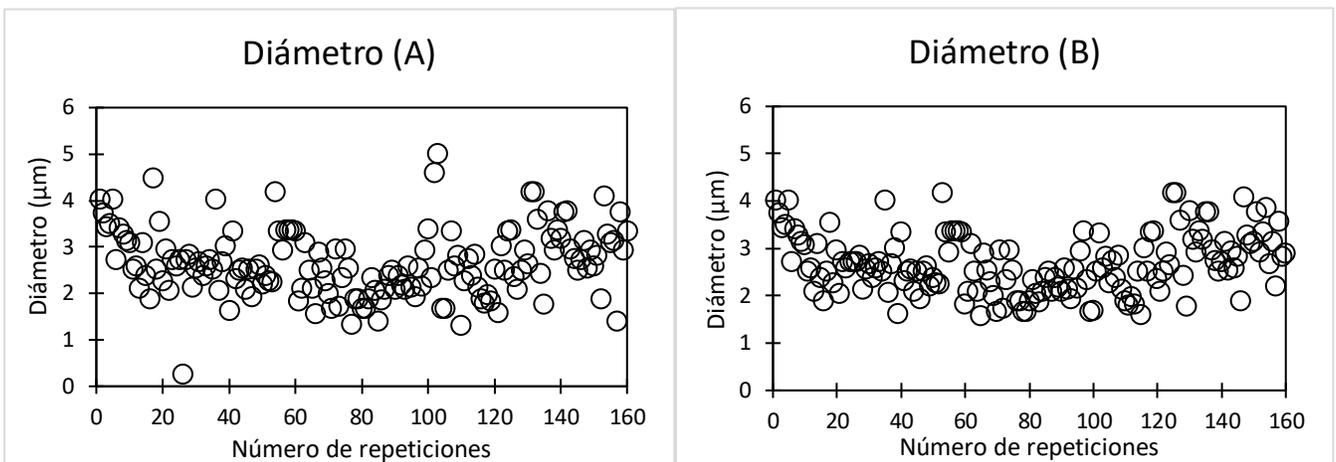


Figura 11.14 Datos de diámetro de la hifa de A. niger CBA 16-6, A) Datos originales, B) Datos corregidos

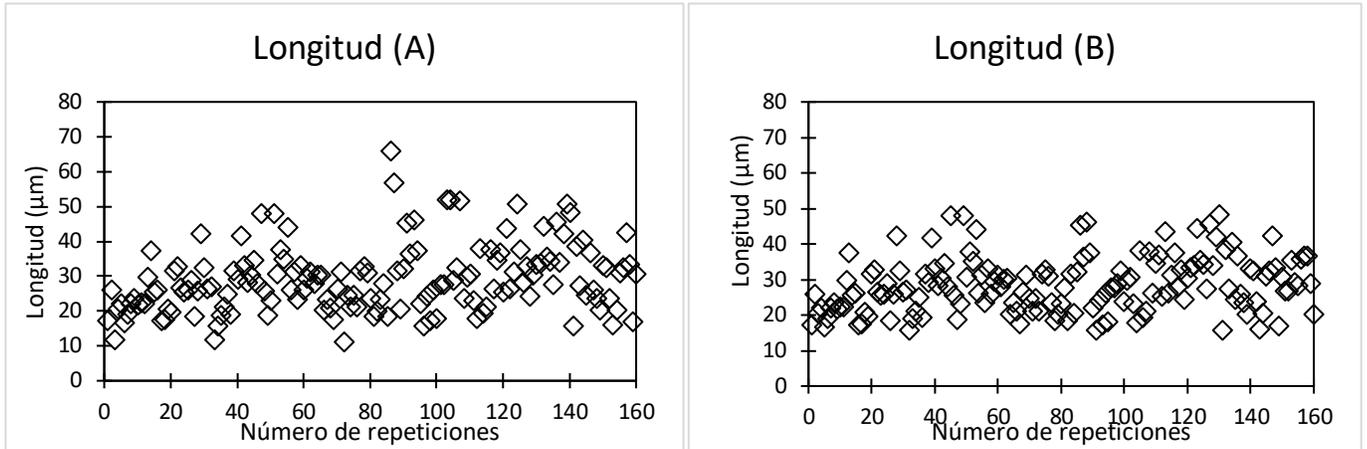


Figura 11.15 Datos de longitud de las hifas de *A. niger* CBR 16-4, A) Datos originales, B) Datos corregidos

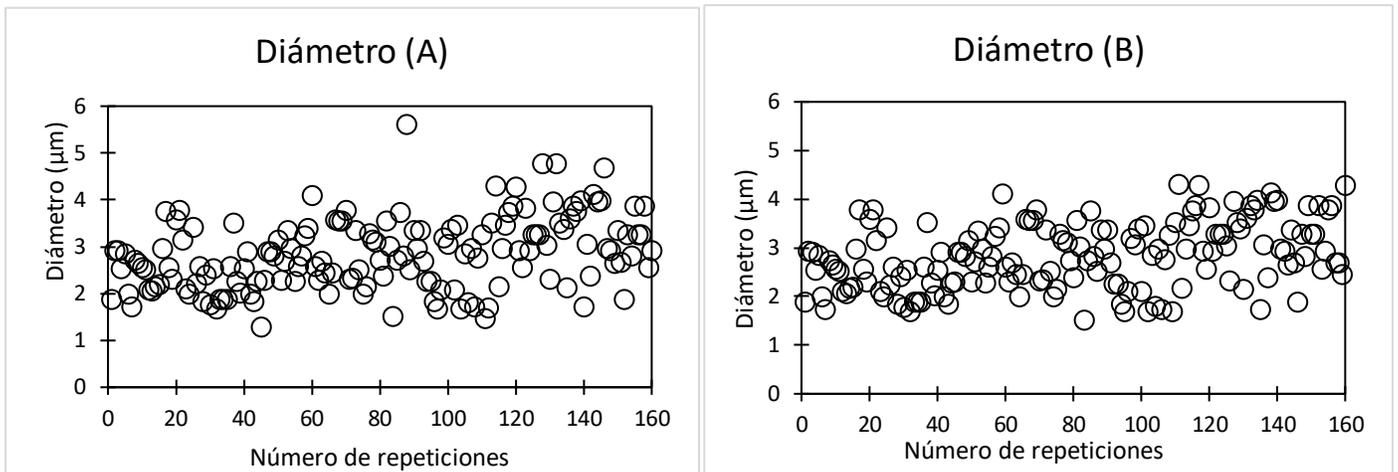


Figura 11.16 Datos de diámetro de la hifa de *A. niger* CBR 16-4, A) Datos originales, B) Datos corregidos

11.4 ANEXO 4 Crecimiento radial de cepas fúngicas

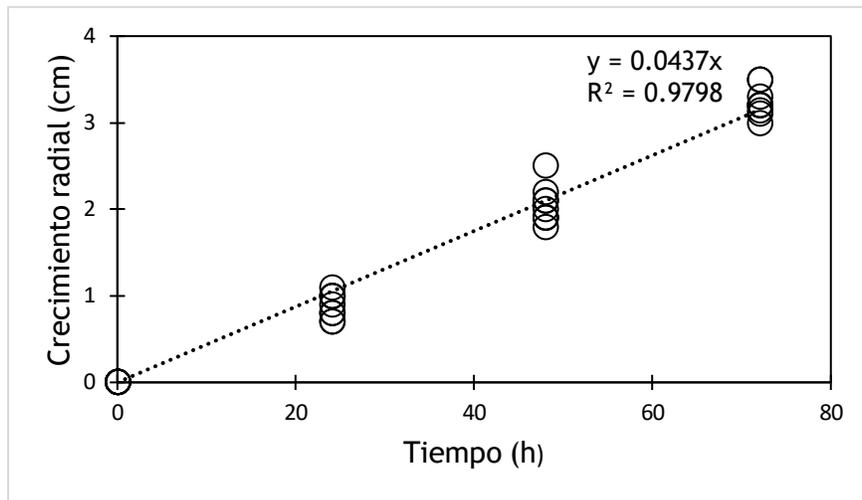


Figura 11.17 Crecimiento radial de cepas fúngicas (*A. niger* CBA 16-6)

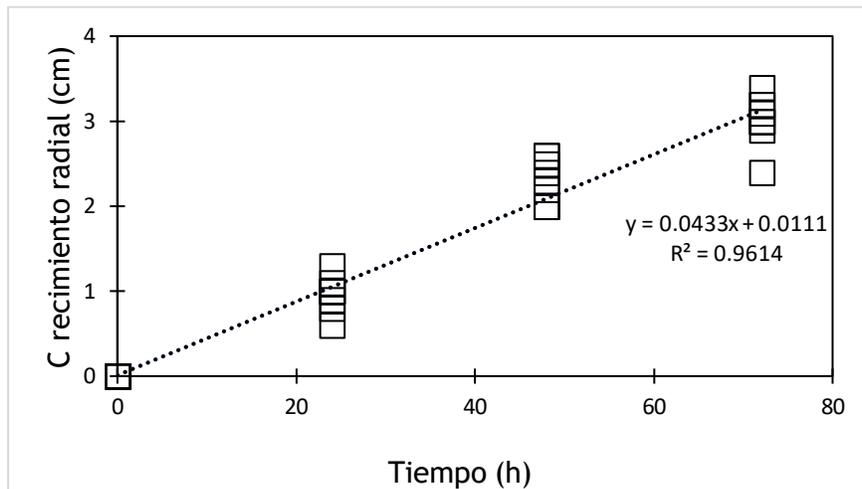


Figura 11.18 Crecimiento radial de cepas fúngicas (*A. tamarii* V12307)

11.5 ANEXO 5 Hidrólisis de ácido clorogénico

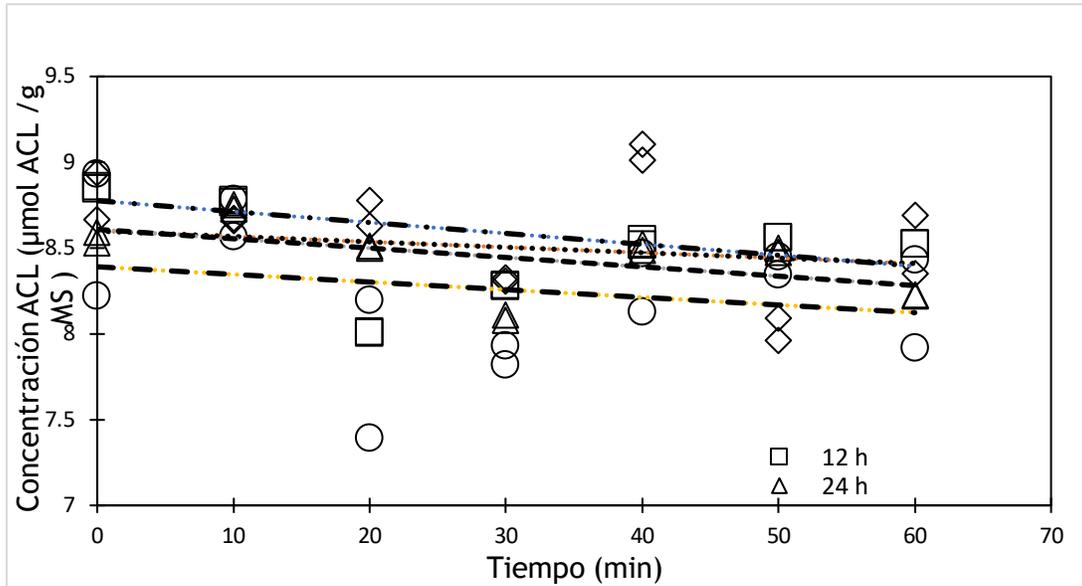


Figura 11.19 Hidrólisis de ácido clorogénico en *A. niger* CBA 16-6

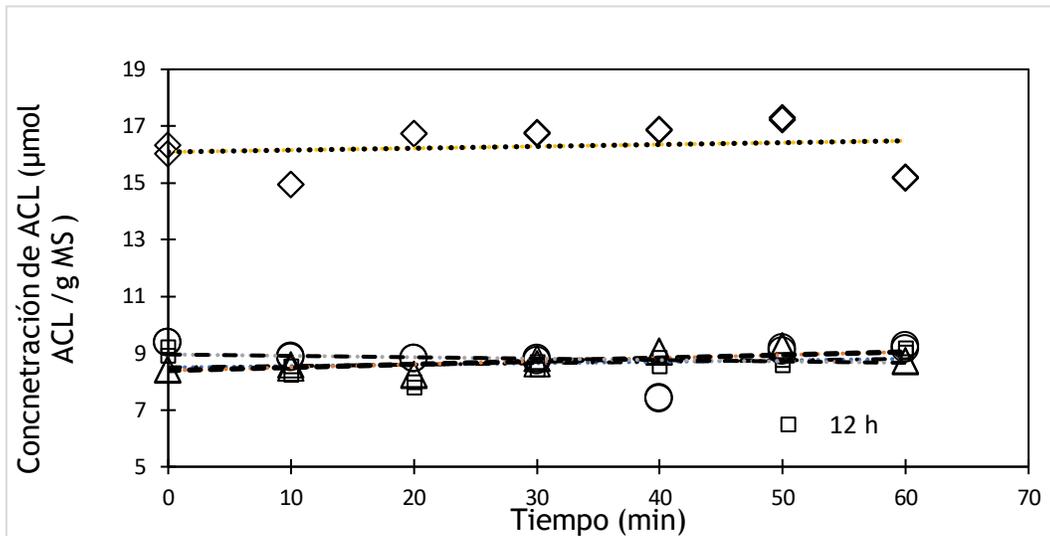


Figura 11.20 Hidrólisis de ácido clorogénico en *A. niger* CBR 16-4

11.6 ANEXO 6 Actividad enzimática

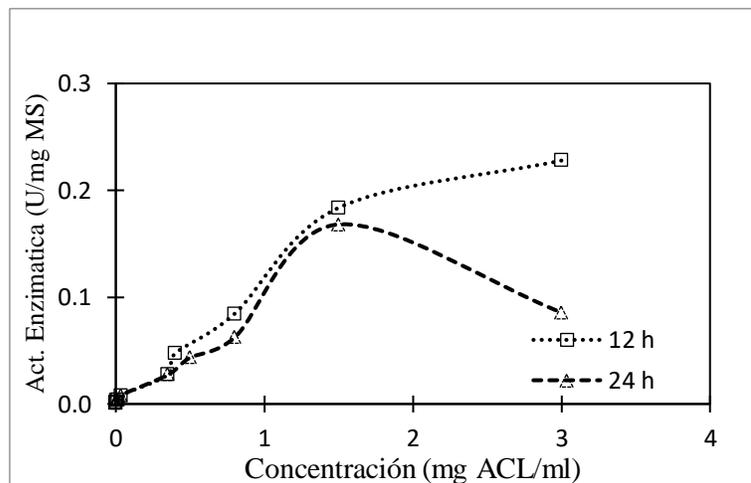


Figura 11.21 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en *A. niger* CBA 16-6

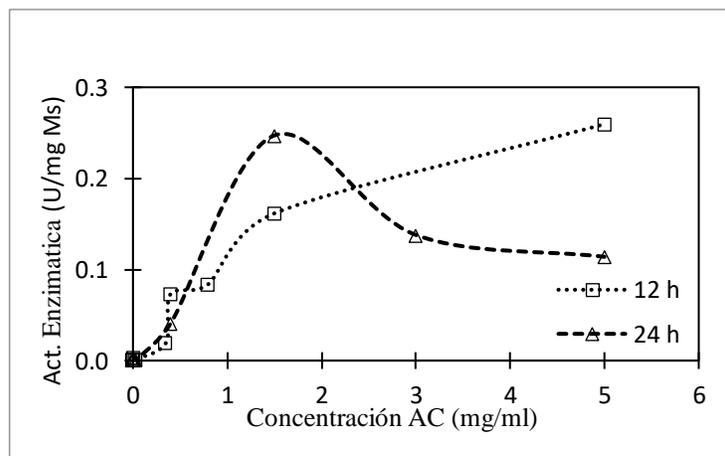


Figura 11.22 Análisis de actividad enzimática clorogenato hidrolasa en *A. niger* CBR 16-4

11.7 ANEXO 7 Modelos de regresión lineal

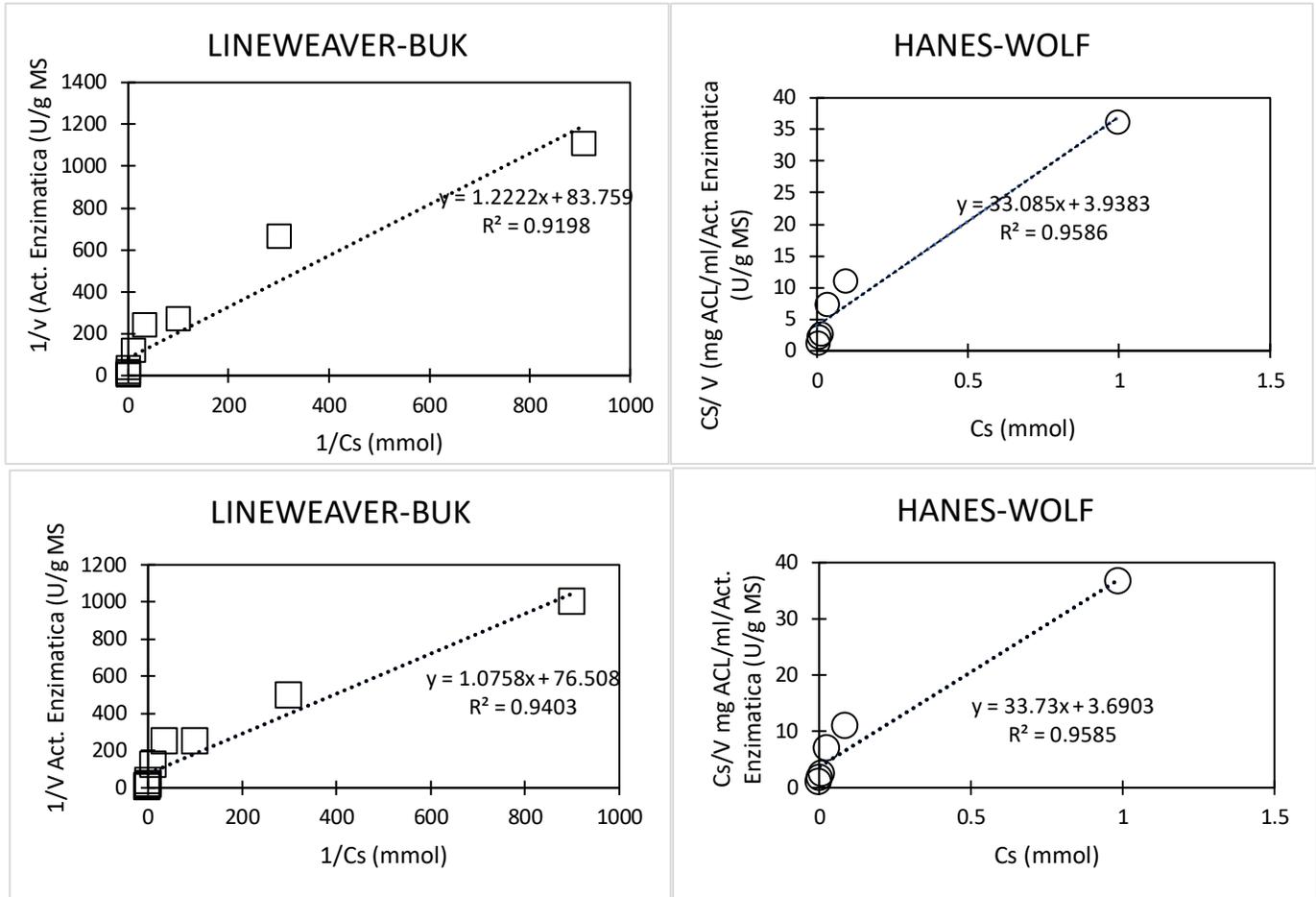
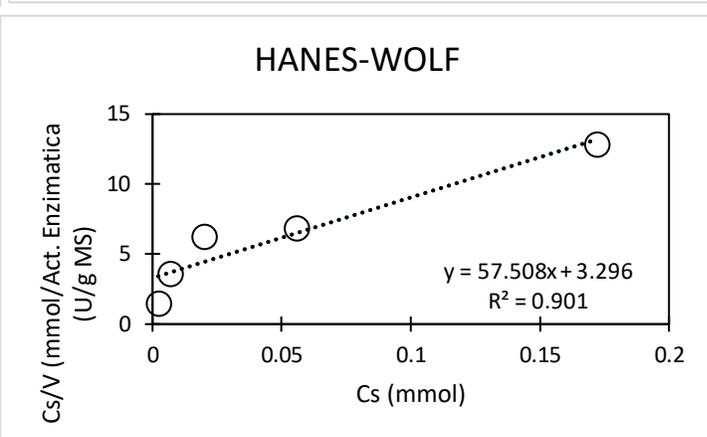
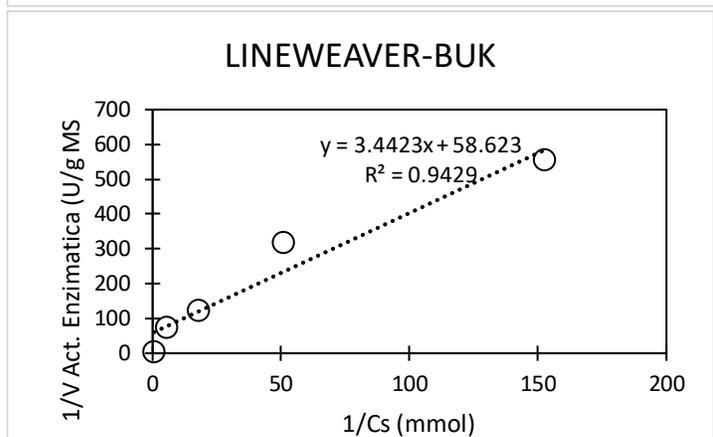
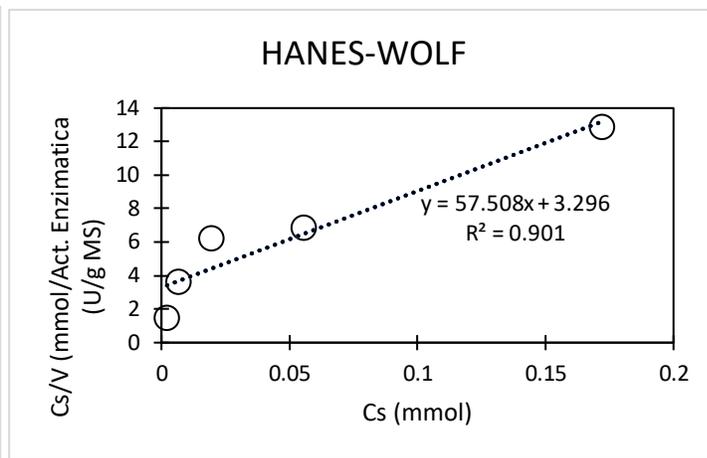
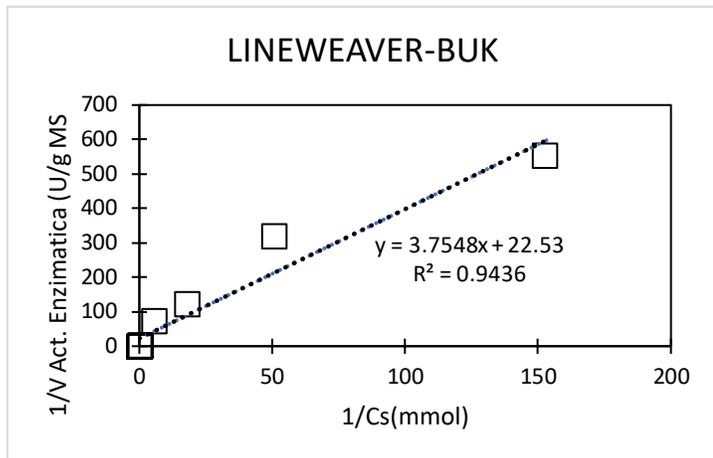
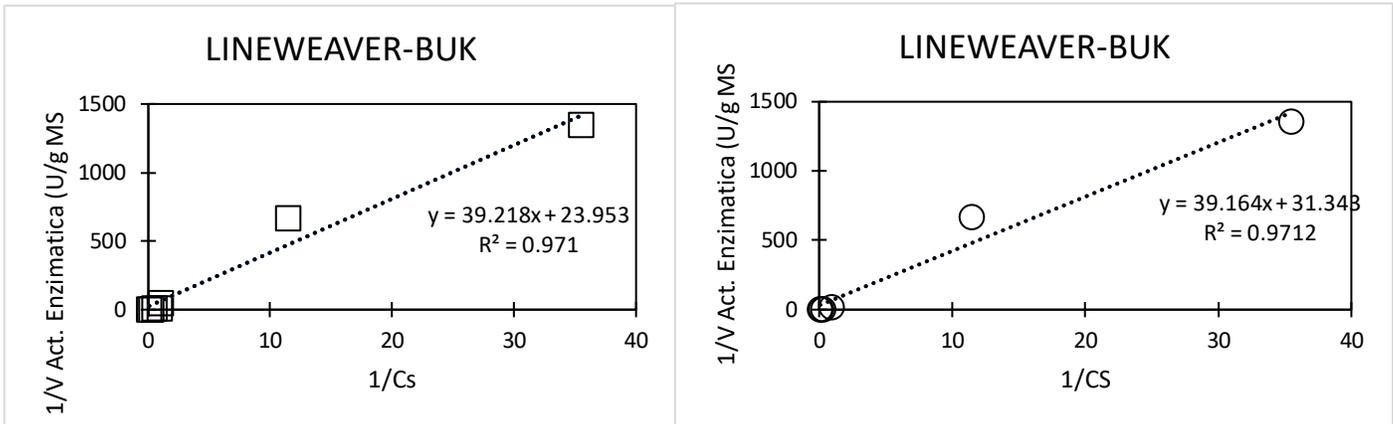


Figura 11.23 Modelos de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido clorogénico con extracto enzimático de 12 y 24 h, para *A. niger* CBA 16-6.



*Figura 11.24 Modelos de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido cafeico con extracto enzimático de 12 y 24 h para *A. niger* CBA 16-6*



*Figura 11.25 Modelo de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido clorogénico con extracto enzimático a 12 y 24 h para *A. niger* CBR 16-4*

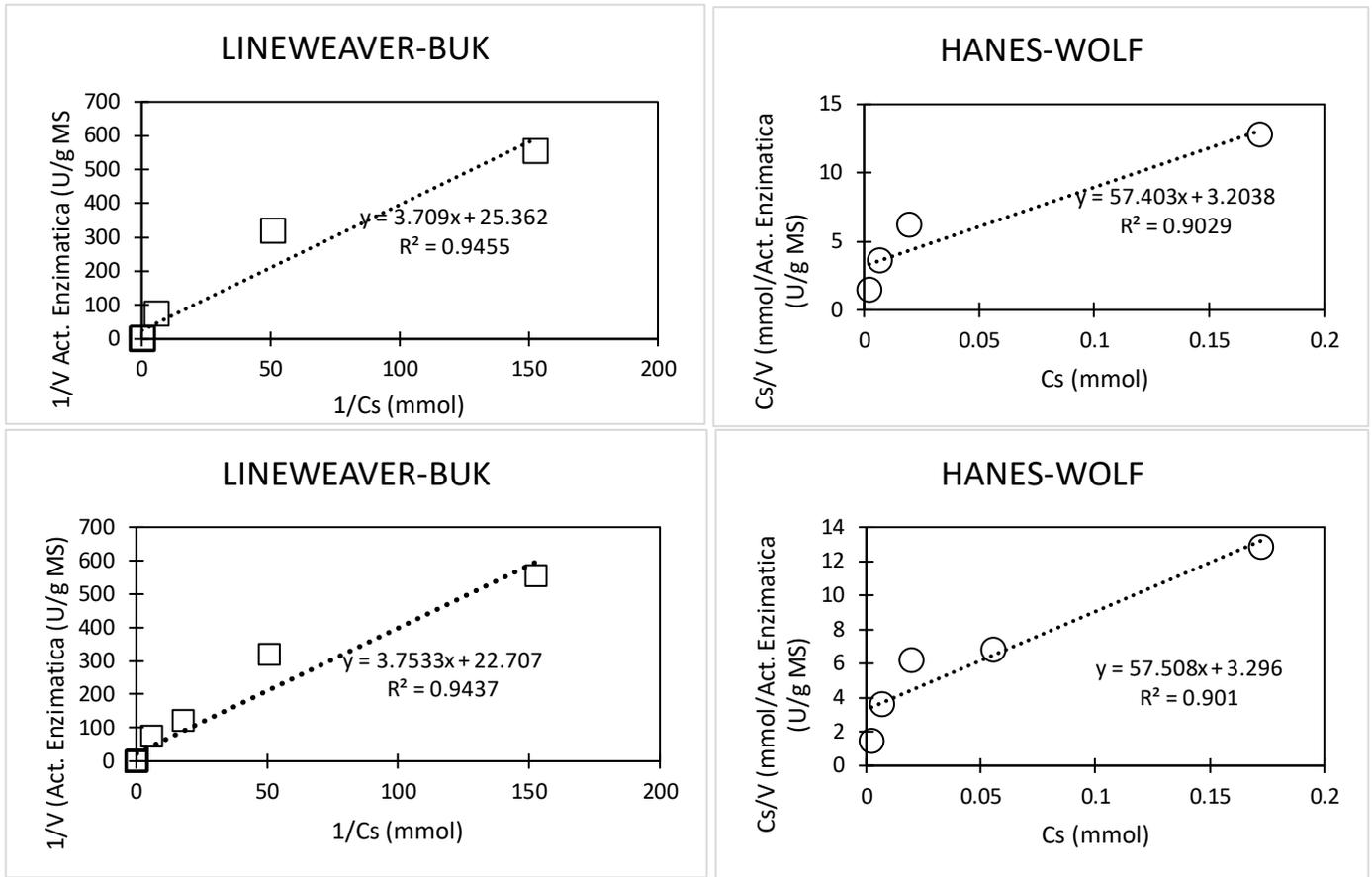


Figura 11.26 Modelos de regresión lineal para la estimación de K_m y V_{max} para ácido cafeico con extracto enzimático a 12 y 24 h para *A. niger* CBR 16-4

11.8 ANEXO 8 Memoria de calculo

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Datos originales

Numero de muestras: número de mediciones tomadas

Promedio: $\frac{\sum x}{n}$

$$\text{Desviación estándar muestral: } \sqrt{\frac{\sum(x-X)^2}{(n-1)}}$$

$$\text{Coeficiente de variación (\%): } \left(\frac{STD}{Promedio}\right) * 100$$

$$L/D = \frac{Promedio longitud}{Promedio diametro}$$

Tabla.11.2 Promedios de longitud y diámetro para las 8 cepas de Aspergillus analizadas, datos originales

| Cepa | Número de mediciones | Promedio | Desviación STD | CV (%) | Longitud (µm) | | Diámetro (µm) | | L/D |
|--------------------------|----------------------|----------|----------------|--------|---------------|----------------|---------------|----------------|-----|
| | | | | | Promedio | Desviación STD | Promedio | Desviación STD | |
| <i>A. japonicus</i> AN5 | 160 | 25.12 | 8.51 | 33.87 | 3.99 | 1.0 | 25.43 | 6.29 | |
| <i>A. orizae</i> 2094 | 160 | 19.83 | 7.48 | 37.73 | 2.44 | 0.84 | 34.35 | 8.12 | |
| <i>A. niger</i> HT4 | 160 | 23.58 | 7.53 | 31.93 | 2.6 | 0.81 | 31.1 | 9.07 | |
| <i>A. niger</i> GH1 | 160 | 41.21 | 14.70 | 35.67 | 4.36 | 0.9 | 20.72 | 9.47 | |
| <i>A. niger</i> PSH | 160 | 40.82 | 15.50 | 37.98 | 5.42 | 1.45 | 26.7 | 7.54 | |
| <i>A. niger</i> CBR16-4 | 160 | 25.5 | 10.42 | 40.85 | 2.67 | 0.71 | 26.47 | 9.56 | |
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | 160 | 30.0 | 10.66 | 35.48 | 2.88 | 0.76 | 26.53 | 10.44 | |
| <i>A. tamarii</i> V12307 | 160 | 24.99 | 9.18 | 36.76 | 3.98 | 1.13 | 28.36 | 6.28 | |

Tomado en cuenta el criterio de datos atípicos u Outliers: Datos extraordinarios para las que el investigador no tiene explicación. En estos casos lo mejor que se puede hacer es replicar el análisis con y sin dichas observaciones con el fin de analizar su influencia sobre los resultados.

Se analizaron los datos originales y excluyendo el 10 % inferior y el 10 % superior esto con el fin de reducir el error, se observa que el porcentaje de coeficiente de variación (medida estadística que informa acerca de la dispersión relativa de un conjunto de datos) disminuye, esto nos arroja que la variación entre los datos es menor.

*Tabla.11.3 Promedios de longitud y diámetro para las 8 cepas de Aspergillus
analizados*

| Cepa | Número de mediciones | Promedio | Desviación STD | CV (%) | Promedio | Desviación STD | CV (%) | L/D |
|----------------------------|----------------------|----------------------------|----------------|--------|----------------------------|----------------|--------|------|
| | | Longitud (μm) | | | Diámetro (μm) | | | |
| <i>A. japonicus</i> AN5 | 160 | 24.69 | 6.20 | 25.10 | 3.84 | 0.72 | 18.81 | 6.42 |
| <i>A. orizae</i> 2094 | 160 | 18.97 | 5.36 | 28.26 | 2.41 | 0.61 | 25.23 | 7.86 |
| <i>A. niger</i> HT4 | 160 | 22.71 | 6.06 | 26.68 | 2.54 | 0.55 | 24.74 | 8.95 |
| <i>A. niger</i> GH1 | 160 | 40.40 | 12.18 | 30.26 | 4.27 | 0.82 | 19.31 | 9.56 |
| <i>A. niger</i> PSH | 160 | 41.54 | 11.83 | 28.47 | 5.43 | 1.15 | 21.26 | 7.65 |
| <i>A. niger</i> CBR16-4 | 160 | 24.87 | 7.94 | 31.90 | 2.68 | 0.62 | 22.99 | 9.29 |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----|-------|------|-------|------|------|-------|-------|
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | 160 | 28.49 | 7.69 | 26.99 | 2.83 | 0.67 | 23.75 | 10.05 |
| <i>A. tamarii</i> V12307 | 160 | 23.72 | 6.94 | 29.24 | 3.90 | 1.95 | 24.37 | 6.09 |

EVALUACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS CON ACTIVIDAD CLOROGENATO HIDROLASA

Índice de potencia

$$IP = \frac{Dh}{Dc}$$

Donde:

IP es el índice de potencia

Dh es el diámetro del halo de aclaramiento debido a la hidrolisis de ACL

Dc es el diámetro de la colonia.

Se calculo el índice de potencia midiendo los diámetros de la colonia y el halo de hidrolisis.

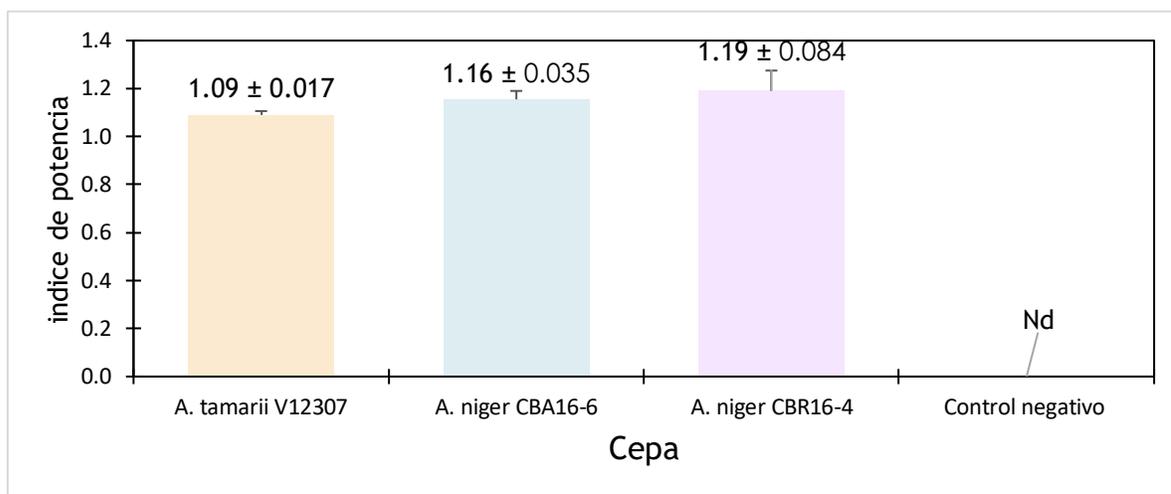


Figura 11.27 Índice de potencia para cada cepa evaluada

CRECIMIENTO RADIAL DE CEPAS FÚNGICAS

Velocidad de crecimiento: por medio de una regresión lineal $Y = mx + b$ en donde la

velocidad corresponde a la pendiente de la recta: $m = \frac{(y-b)}{x}$

Error: $\frac{\text{valor del coeficiente} - \text{valor inferior al 95 \% de confianza}}{\text{valor del coeficiente}} * 100$

R²: coeficiente de determinación

Tabla 11.4 Crecimiento radial de cepas fúngicas

| Cepa | Velocidad de crecimiento (cm/h) | Error (%) | R ² |
|--------------------------|---------------------------------|-----------|----------------|
| <i>A. tamarii</i> V12307 | 0.043 ± 0.003 | 6.98 | 0.96 |
| <i>A. niger</i> CBR16-4 | 0.049 ± 0.002 | 4.24 | 0.98 |
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | 0.044 ± 0.001 | 3.05 | 0.99 |

CARACTERIZACIÓN DE LA PULPA DE CAFÉ

Se utilizo estándares internos de ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido quínico y ácido p-cumàrico, con las concentraciones y el área obtenida en el HPLC realizamos una regresión lineal para obtener la pendiente y la ordena al origen, estos datos se utilizaron para calcular la concentración de cada compuesto presente en las muestras analizadas ($x = \frac{y-b}{x}$)

Tabla 11.5 Cuantificación de ácidos fenólicos y ácidos hidroxicinámicos en muestras

de pulpa de café proveniente del estado de Chiapas

| Compuesto | Extracción Metanólica (mg/g MS) | Hidrolisis alcalina (mg/ g MS) | Ácidos fenólicos totales * (%) | Total (mg/g MS) |
|--------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| Ácido clorogénico | 4.19 ± 0.0072 | 0.95 ± 0.75 | 84.18 | 5.14 ± 0.082 |
| Ácido cafeico | Nd | 0.65 ± 0.23 | 10.15 | 0.65 ± 0.23 |
| Ácido ferúlico | 0.146 ± 0.003 | 0.056 ± 0.014 | 3.31 | 0.202 ± 0.017 |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 0.082 ± 0.002 | 0.032 ± 0.0001 | 2.29 | 0.114 ± 0.002 |

Nd= no detectado, * Ácidos fenólicos totales extraídos y cuantificados

Fermentación en medio solido

Se modela la tasa de producción de CO₂ con el modelo utilizando el método logístico

$$CO_2 = \frac{CO_{2max}}{1 + \left(\frac{CO_{2max}}{CO_{20}} - 1\right) * \exp(-\mu_{CO_2} \cdot t)}$$

Donde:

CO₂ = Producción total de CO₂

μ_{CO₂} = Tasa específica de producción de CO₂

CO_{2 max} = Máxima producción de CO₂

Con este modelo se obtuvieron graficas que describen el comportamiento de *Aspergillus* en fermentación en medio solido usando pulpa de café como soporte y como sustrato.

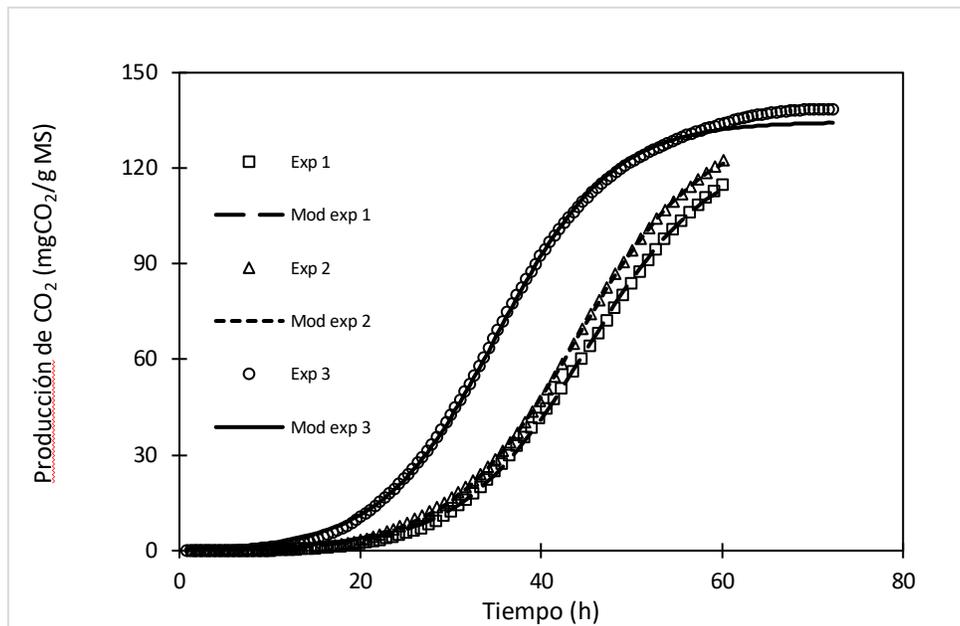


Figura 11.28 Producción de CO₂ en pulpa de café adicionada con glucosa para A. niger CBA 16-6

Cálculos aproximados con solver en Excel

μ_{CO_2} (h⁻¹): tasa específica de producción de CO₂

CO₂ Max (mg/ g MS): concentración máxima de CO₂

T dCO₂ Max (h): tiempo de producción máxima de CO₂

CO₂ Max (mg/ h g MS): concentración máxima de CO₂ con respecto al tiempo

Tabla 11.6 Parámetros cinéticos obtenidos en fermentación en medio sólido con pulpa de café

| Microorganismo | Condición | μ_{CO_2} (h ⁻¹) ^a | CO ₂ Max (mg/ g MS) _a | T dCO ₂ Max (h) ^a | CO ₂ Max (mg/ h g MS) | T dCO ₂ Max (h) | R ² ^a |
|-----------------------------|------------------------------|---|---|--|-------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| <i>A. niger</i> CBA16-6 | Pulpa de café sin glucosa | 0.3±0.02 | 99.9 ± 1.5 | 51.9 ± 0.1 | 4.0±0.2 | 38.4 ± 0.1 | 0.99 ± 0.002 |
| | | 0.2±0.07 | 98.8 ± 4.3 | 60.4 ± 0.6 | 3.7 ± 0.3 | 42.4 ± 0.6 | 0.99 ± 0.001 |
| | Pulpa de café con glucosa | 0.20±0.03 | 129.7±4.9 | 60.1 ± 0.1 | 5.5 ± 0.2 | 34.5±0.1 | 0.99±0.0001 |
| | | 0.4±0.02 | 133.9±1.0 | 72.2± 0.1 | 4.9 ± 0.3 | 43.6 ± 0.1 | 0.99 ± 0.003 |
| <i>A. niger</i> CBR 16-4 | Pulpa de café sin glucosa | 0.2 ± 0.04 | 36.1 ± 0.8 | 33.7±0.6 | 2.5±0.3 | 16.3 ±0.1 | 0.99±0.0004 |
| | | 0.4 ± 0.01 | 52.7 ± 0.5 | 50.1±0.5 | 2.5±0.2 | 27.7 ± 0.3 | 0.99 ± 0.007 |
| | Pulpa de café con glucosa | 0.4 ±0.1 | 64.4 ± 6.7 | 34.1±0.001 | 5.0±0.6 | 24.9 ± 0.1 | 0.99 ± 0.001 |
| | | 0.6±0.01 | 98.5 ± 0.7 | 49.0 ± 0.002 | 3.0 ± 0.1 | 20.6 ±0.2 | 0.99 ± 0.006 |

a= μ_{CO_2} , CO₂ Max, T d CO₂ Max, R² = modelo logístico; μ_{CO_2} , tasa específica de producción de CO₂; CO₂ Max, producción máxima de CO₂; T d CO₂ Max, tiempo de producción máxima de CO₂; R² = coeficiente de determinación del modelo logístico.

PRODUCCIÓN DE EXTRACTOS ENZIMÁTICOS

Se utilizo estándares internos de ácido clorogénico y ácido cafeico para cuantificar la concentración de cada compuesto distintos tiempos de muestreo durante la fermentación sólida y de manera indirecta la actividad enzimática, al cuantificar la concentración de ácido cafeico que es producto de la hidrolisis de ácido clorogénico, con las concentraciones y el área obtenida

en el HPLC realizamos una regresión lineal para obtener la pendiente y la ordena al origen, estos datos se utilizaron para calcular la concentración de cada compuesto presente en las muestras analizadas ($x = \frac{y-b}{x}$)

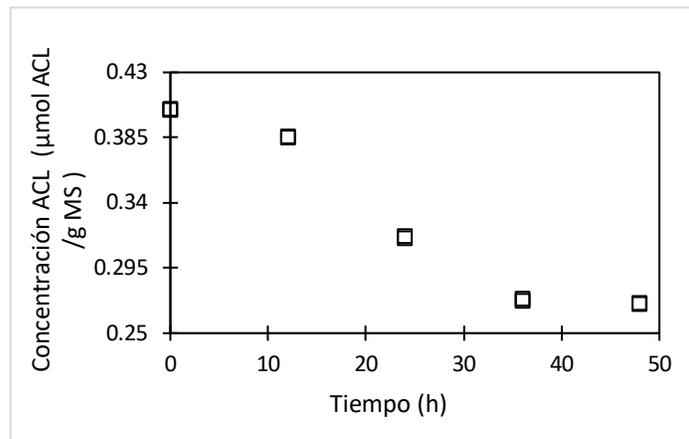


Figura 11.29 Concentración de ácido clorogénico para *A. niger* CBR 16-4

REACCIÓN ENZIMÁTICA

Tomando cada punto de muestreo se determinó el punto de mayor actividad enzimática

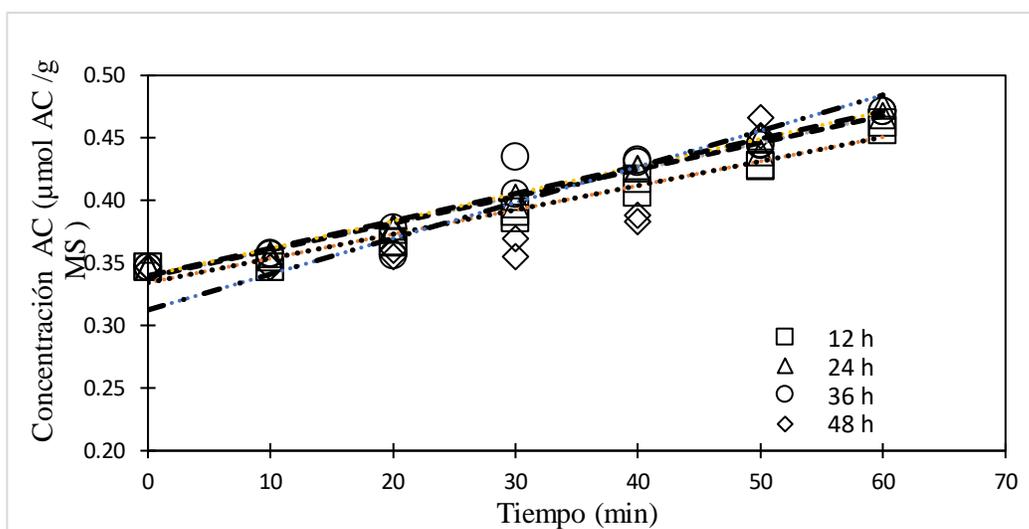


Figura 11.30 Formación de ácido cafeico para A. niger CBA 16-6

Se realizó una regresión lineal con el fin de obtener la pendiente y el coeficiente de coeficiente de determinación para cada tiempo de muestreo y así identificar el tiempo de mayor actividad enzimática.

Para calcular los gramos de materia seca tomamos en consideración la humedad al 60 % por lo tanto solo el 40 % es de materia húmeda (0.4 g), se tomaron 5 g de materia fermentada y se extrajeron con 12.5 ml de buffer de fosfatos.

$$\text{materia seca} = \frac{5g \text{ materia húmeda} * 0.4 g \text{ materia seca}}{12.5ml \text{ de buffer g de materia húmeda}} = 0.16 g \text{ materia seca} * ml^{-1}$$

Se colocaron 0.1 ml de extracto enzimático en la reacción.

$$\left(\frac{0.16 g \text{ materia seca}}{ml} \right) * (0.1 ml) = 0.016 g \text{ materia seca}$$

Para estimar la actividad enzimática

Ejemplo cepa *A. niger* CBA 16-6 a una concentración de ácido clorogénico para la reacción enzimática de 0.99 mM

Concentración del blanco – concentración del punto

$$\left(0.4983 \frac{mg}{ml} \right) - \left(0.40 \frac{mg}{ml} \right) = 0.0983 \frac{mg}{ml}$$

Dividimos el resultado entre el tiempo de reacción

$$\frac{0.0983 \frac{mg}{ml}}{60min} \cdot 0.00164 \frac{mg}{ml * min}$$

Se requiere expresar todo en unidades enzimática de actividad específica (número de unidades de enzima por mg de proteína o ml de disolución), al tener una fermentación en medio sólido se requiere que las unidades sean unidades de enzima por mg de materia seca.

Una unidad de enzima se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μmol de sustrato en un minuto

Lo dividimos entre el peso molecular de ácido clorogénico $\text{PM}=354.3 \text{ mg/mmol}$

$$0.00164 \frac{\text{mg}}{\text{ml} * \text{min}} = \frac{\text{ml} * \text{mmol}}{354.3 \text{ mg}} = 4 \times 10^{-6} \frac{\text{mmol}}{\text{min}}$$

Lo convertimos a micromol por minuto para así tener unidades enzimáticas

$$\frac{4 \times 10^{-6} \text{mmol}}{\text{min}} * \frac{1000 \mu\text{mol}}{1 \text{mmol}} = 4.6 \times 10^{-3} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$$

Lo dividimos por los gramos de materia seca

$$\frac{4.6 \times 10^3 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}}{0.016 \text{ g materia seca}} = 2.8 \times 10^{-1} \frac{\mu\text{mol}}{\text{gr de materia seca} * \text{min}}$$

Lo que es equivalente a

$$\frac{2.8 \times 10^{-1} U}{\text{gr de materia seca}}$$

Tabla 11.7 Parámetros de regresión lineal

| Cepa | Tiempo de muestreo (h) | Pendiente ($\mu\text{mol ACL/g MS} \cdot \text{min}^{-1}$) | Error (%) | r^2 |
|-------------------------|------------------------|--|-----------|-------|
| <i>A. niger</i> CBR16-6 | 12 | 0.002 ± 0.0002 | 12.2 | 0.96 |
| | 24 | 0.002 ± 0.0002 | 8.0 | 0.98 |
| | 36 | 0.002 ± 0.0004 | 16.7 | 0.93 |
| | 48 | 0.003 ± 0.0009 | 33.6 | 0.77 |
| <i>A. niger</i> CBA16-4 | 12 | 0.005 ± 0.0007 | 15.1 | 0.94 |
| | 24 | 0.003 ± 0.0004 | 13.0 | 0.95 |
| | 36 | 0.009 ± 0.003 | 38.2 | 0.73 |
| | 48 | 0.008 ± 0.002 | 20.7 | 0.90 |

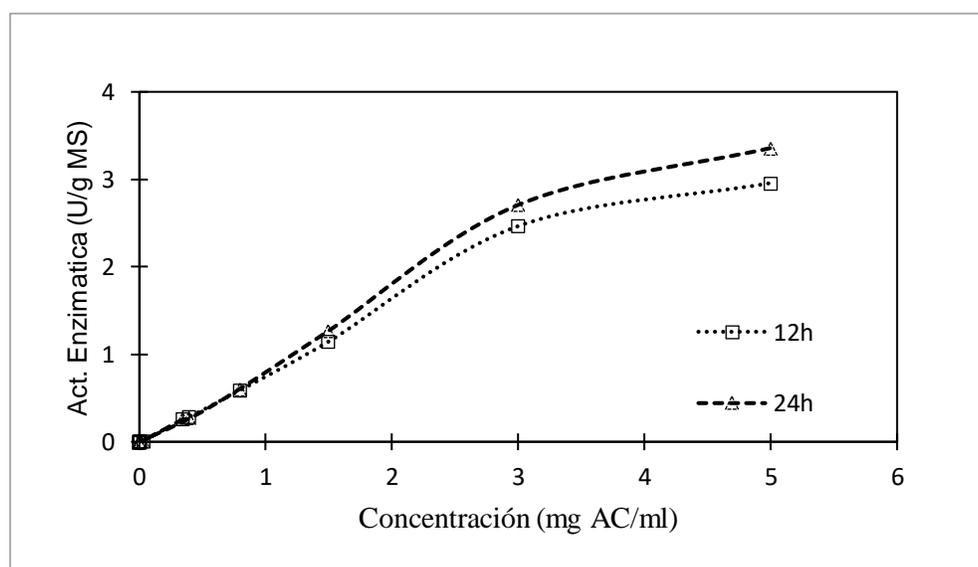


Figura 11.31 Análisis de la actividad clorogenato hidrolasa en *A. niger* CBA 16-4

ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

Se decidió la utilización de los extractos enzimáticos a 12 y 24 h de cultivo y se determinó que se adaptan al modelo de Michaelis-Menten y por medio de modelos de regresión lineal (Lineweaver-Burk y Hanes-Wolf) se estimaron los parámetros enzimáticos K_m y V_{max} para cada cepa evaluada bajo las condiciones indicadas.

Tabla 11.8 Modelos de regresión lineal para cinéticas con comportamiento de Michaelis-Menten

Los datos de concentración tenían unidades de mg/ml con el peso molecular de ACL = 354.3

| Método | Ecuación | Gráfica |
|-------------------|---|---------|
| Lineweaver – Burk | $\frac{1}{v} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) * \left(\frac{1}{[S]}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right)$ <p>Ordenada $b = \frac{1}{V_{max}}$</p> <p>Pendiente $m = \frac{K_m}{V_{max}}$</p> | |
| Hanes – Wolf | $\frac{[S]}{V} = \left(\frac{K_m}{V_{max}}\right) + \left(\frac{1}{V_{max}}\right) * [S]$ | |

mg/mmol y AC = 180.156 mg/mmol y 1L = 1000 ml

Si tenemos

$$y = mx + b$$

$$m = \frac{K_m \text{ mmol} * gMS}{V_{max} U}$$

$$b = \frac{1}{V_{max}} = \frac{gMS}{U}$$

$$y = 3.7533x + 22.707$$

Despejamos V_{max}

$$V_{max} = \frac{1}{b}$$

$$V_{max} = \frac{1}{22.707} = 0.044 \frac{U}{g MS}$$

Despejamos K_m

$$K_m = m * V_{max}$$

$$K_m = 3.7533 \frac{\text{mmol} * gMS}{U} * 0.044 \frac{U}{g MS} = 0.165 \text{ mmol}$$

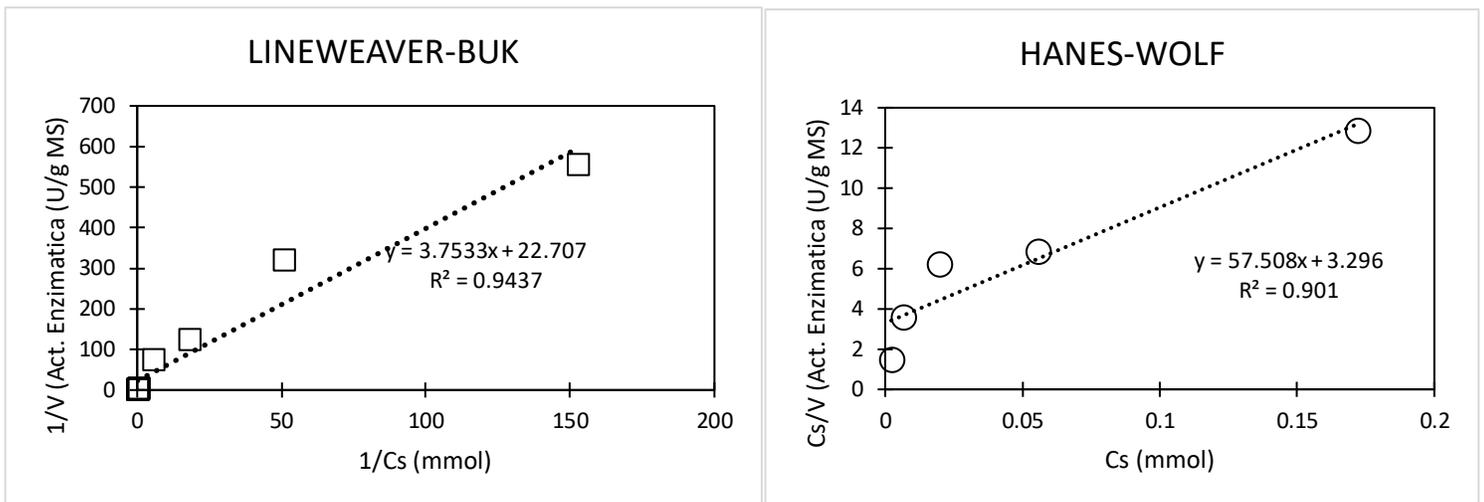


Figura 11.32 Modelos de regresión lineal para la estimación de parámetros cinéticos K_m y

*V_{max}**Tabla 11.9 Valores de Km y V_{max} para clorogenato hidrolasa, para A. niger CBA16-4*

| Compuesto | Tiempo de Extracto (h) | Método | Km (mmol) | V _{max} (U/g Ms) | R ² |
|-------------------|------------------------|--------|------------------------|---------------------------|----------------|
| Ácido clorogénico | 12 | L-B | 1.64 | 4.2 x10 ⁻² | 0.97 |
| | 24 | L-B | 1.25 | 9.0 x10 ⁻² | 0.97 |
| Ácido cafeico | 12 | L-B | 1.46 x10 ⁻¹ | 2.19 x10 ⁻¹ | 0.95 |
| | | H-W | 5.58 x10 ⁻² | 9.67 x10 ⁻² | 0.98 |
| | 24 | L-B | 9.18 x10 ⁻¹ | 2.44 x10 ⁻¹ | 0.94 |
| | | H-W | 5.73 x10 ⁻² | 9.65 x10 ⁻² | 0.96 |



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00276

Matrícula: 2173801817

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CLOROGENATO HIDROLASA DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS AISLADAS DE LA PULPA DE CAFÉ.

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 12:00 horas del día 10 del mes de noviembre del año 2020 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del posgrado:

DR. SERGIO HUERTA OCHOA
M. EN B. MARIA EUGENIA AGUILAR ALVAREZ
DRA. ELENA ISABEL CHAMPION MARTINEZ
DR. LUIS VICTOR RODRIGUEZ DURAN



Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

DE: CLAUDIA KARINA PACHECO MARTINEZ

CLAUDIA KARINA PACHECO MARTINEZ

ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

VOCAL

M. EN B. MARIA EUGENIA AGUILAR ALVAREZ

VOCAL

DRA. ELENA ISABEL CHAMPION MARTINEZ

SECRETARIO

DR. LUIS VICTOR RODRIGUEZ DURAN