

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



Casa abierta al tiempo

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS TIPO FERULOIL ESTERASA POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO EN PULPA DE CAFÉ

Tesis que para obtener el grado de
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

GLADYS GABRIELA PÉREZ MORALES
Ingeniero Químico

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Dr. Christopher Augur
Dr. Francisco Cruz Sosa
Dra. Ma. Ascensión Ramírez Coronel
Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Director de tesis
Presidente
Secretario
Vocal
Vocal

México, D.F.

Agosto 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**



Casa abierta al tiempo

PRODUCCIÓN DE ENZIMAS TIPO FERULOIL ESTERASA POR FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO EN PULPA DE CAFÉ

Tesis que para obtener el grado de
MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

GLADYS GABRIELA PÉREZ MORALES
Ingeniero Químico

**SUSTENTADA EL 13 DE AGOSTO DE 2008,
ANTE EL JURADO INTEGRADO POR**

Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Dr. Christopher Augur
Dr. Francisco Cruz Sosa
Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel
Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Director de tesis
Presidente
Secretario
Vocal
Vocal

Realizada en la Planta Piloto de Fermentación en Medio Sólido, UAM-I

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-0/Maestría en Biotecnología**

Trabajo financiado por el Programa Nacional de Postgrados (PNP) con su programa nacional de becas y con recursos del Fondo Sectorial SAGARPA CONACYT 2005, con el proyecto titulado “Producción de antioxidantes y precursores de vainillina a partir de la pulpa de café” (12182).

Iztapalapa, D.F. a 13 de agosto de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS TIPO FERULOIL ESTERASA POR
FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO
EN PULPA DE CAFÉ**

Que presentó
GLADYS GABRIELA PÉREZ MORALES

Director:
Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

JURADO

Asesor:
Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor:
Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Sinodal:
Dr. Christopher Augur
IRD, Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III)

Sinodal:
Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Universidad Autónoma del Estado de Coahuila

A Dios

A Oswaldo, por su apoyo y cariño.

A mis padres, hermanos y familia.

*“Es de importancia para quien desea alcanzar una certeza
en su investigación, el saber dudar a tiempo”*

Aristóteles

A G R A D E C I M I E N T O S

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y por su apoyo para que esta tesis pudiera realizarse.

A la Dra. Ascensión Ramírez por su gran apoyo, por su guía y sobre todo su amistad.

Al Dr. Francisco Cruz por su colaboración y observaciones a mi trabajo

Al Dr. Christopher Augur por sus acertados comentarios y correcciones a mi trabajo

A la Dra. Arely Prado, Dr. Sergio Huerta y Dr. Ernesto Favela por ayudarme en mi formación profesional.

A la Dra. Patricia Larralde Corona (CINCESTAV-Reynosa), Dr. César Hernández Rodríguez (Ciencia Biológicas-IPN) y Dr. Ramón Verde Calvo (UAM-Iztapalapa) por su colaboración en este trabajo.

A mis compañeros de generación de la maestría, por su buen sentido del humor que hicieron tan amenas siempre las clases.

A todos y cada uno de los integrantes de la Planta Piloto 4, especialmente a Doña María Elena, Rosa Isela, Danae, Candy, Edna y a los integrantes del Proyecto de Tratamiento de Residuos Sólidos Orgánicos.

CONTENIDO

	Páginas
CONTENIDO	i
Lista de Tablas	iii
Lista de Figuras	iv
Glosario de Abreviaturas y Símbolos	vi
RESUMEN/ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO	5
2.1 Ácidos hidroxicinámicos	5
2.1.1 Estructura química	5
2.1.2 Importancia a nivel industrial	6
2.2 Distribución en la pared celular vegetal	7
2.2.1 Estructura de la pared celular vegetal	7
2.2.2 El ácido ferúlico y sus dímeros en la pared celular vegetal	9
2.2.3 En monocotiledóneas	12
2.2.4 En dicotiledóneas	13
2.3 Feruloil esterasas	14
2.3.1 Clasificación	14
2.3.2 Producción microbiana de las feruloil esterasas	15
2.4 Pulpa de café	21
2.5 Fermentación en medio sólido	22
2.6 Antecedentes directos	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Material biológico	29
5.1.1 Origen de las cepas	29
5.1.2 Propagación y conservación de las cepas	30
5.2 Reactivos químicos	30
5.3 Preparación de la pulpa de café	30
5.3.1 Origen de la pulpa	30
5.3.2 Tratamiento de la pulpa de café	31
5.4 Extracción de ácidos hidroxicinámicos no esterificados	31
5.4.1 Extracción con diferentes mezclas de disolventes	31
5.4.2 Metodología de superficies de respuestas (MSR)	31
5.5 Análisis para selección de la cepa	33
5.5.1 Halos de hidrólisis de actividad feruloil esterasa	33
5.5.2 Halos de hidrólisis de actividad pectinasa	34
5.6 Fermentación en medio sólido utilizando pulpa de café	34
5.6.1 Medios y condiciones de cultivo	34
5.6.2 Extracto enzimático	36

5.6.3 Condiciones de cultivo seleccionadas	36
5.7 Técnicas analíticas	36
5.7.1 Observaciones al microscopio	36
5.7.2 pH	36
5.7.3 Humedad	37
5.7.4 Medición indirecta del crecimiento por CO ₂	37
5.7.5 Conteo de esporas	38
5.7.6 Método de fenol-sulfúrico	39
5.7.7 Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos y derivados por HPLC	39
5.7.8 Actividad feruloil esterasa	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Selección del disolvente para la extracción de AH no esterizados	43
6.2 Optimización de la extracción de ácidos hidroxicinámicos mediante MSR	46
6.3 Criterio de selección de la cepa	50
6.3.1 Determinación de la actividad feruloil esterasa por halos de hidrólisis	50
6.3.2 Determinación de la actividad pectinasa por halos de hidrólisis	51
6.4 Fermentación en medio sólido	53
6.4.1 Fermentación sólida tipo Koji	54
6.4.2 Fermentación en medio sólido con aireación por convección forzada	55
6.4.3 Fermentación con diferentes proporciones del medio de cultivo	58
6.4.4 Cinéticas de fermentación	62
7. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	69
8. REFERENCIAS	72
9. ANEXO	80
A1. Medios de cultivo	80
A2. Secuencia	81
A3. Análisis de varianza	82

LISTA DE TABLAS

TABLA		Páginas
1.1	Clasificación propuesta para las feruloil esterasas basado en su secuencia y especificidad por el sustrato (Hermoso <i>et al.</i> , 2004).	15
1.2	Microorganismos que producen feruloil esterasas en cultivo sumergido (Topakas <i>et al.</i> , 2007).	16
1.3	Microorganismos que producen feruloil esterasas en cultivo sólido (Topakas <i>et al.</i> , 2007).	20
5.1	Microorganismos utilizados en este estudio.	29
5.2	Diseño factorial para la extracción de los ácidos hidroxicinámicos.	32
6.1	Valores de los coeficientes y R^2 del análisis por superficie de respuesta para los sólidos solubles, los ácidos hidroxicinámicos y los azúcares totales.	47
6.2	Valores de t_{lag} y μ_{CO_2} de la fermentación en pulpa de café con <i>Aspergillus tamarii</i> . V12307 con y sin medio propuesto por Asther (2002)	57
6.3	Efecto de la adición de diferentes proporciones de medio de cultivo a la pulpa de café.	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Páginas
1.1 Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos.	6
1.2 Representación esquemática de la región espacial de la pectina (De Vries y Visser, 2001).	8
1.3 Estructura de la pared celular y las microfibrillas de celulosa (http://www.biologia.edu.ar).	9
1.4 Modelo de la pared celular de la remolacha azucarera mostrando al ácido ferúlico y diferúlico (Saulnier y Thibault, 1999).	10
1.5 Ácido ferúlico y sus dímeros (De Vries y Visser, 2001).	11
1.6 Esquema de la estructura de la pared celular representando al polímero unido formando puentes con dímeros de ácido ferúlico.	12
1.7 Corte longitudinal de la cereza de café (Avallone, 2001).	22
6.1 Extracción de la pulpa de café a 45 °C por 20 minutos.	43
6.2 Pérdida de peso en la pulpa de café.	44
6.3 Análisis de azúcares a liofilizados.	44
6.4 Extracción de ácidos hidroxicinámicos con diferentes proporciones de disolventes.	45
6.5 Extracción en rotavapor.	46
6.6 Curvas de nivel para los AH analizados: a) ácido clorogénico, b) ácido caféico, c) ácido <i>p</i> -cumárico y d) ácido ferúlico.	48
6.7 Curvas de nivel a) Pérdida de peso en PC (mg/Kg de PC seca) y b) Azúcares totales (g de hexosas/Kg de PC seca).	49
6.8 Halos de hidrólisis de la actividad feruloil esterasa para: (a) la enzima comercial pectinasa de <i>Aspergillus niger</i> y (b) <i>Aspergillus tamarisii</i> V12307.	51
6.9 Halos de hidrólisis de actividad pectinasa de: (a) Enzima comercial pectinasa de <i>Aspergillus niger</i> y (b) <i>Aspergillus tamarisii</i> V12307.	52
6.10 Preparaciones de <i>Aspergillus tamarisii</i> V12307 observadas al microscopio (10X y 40X).	53

6.11	Cromatografía en capa fina para determinar la actividad feruloil esterasa de los extractos obtenidos de la fermentación tipo Koji.	54
6.12	Fermentación en columnas: a) Pulpa de café y b) Pulpa de café adicionada con medio reportado por Asther (2002).	55
6.13	Producción acumulada del CO ₂ en fermentación en columna de <i>Aspergillus tamarisii</i> V12307 utilizando únicamente pulpa de café y pulpa de café adicionada con medio mineral adicionado con maltosa.	56
6.14	Comportamiento del lnCO ₂ con respecto al tiempo en las columnas adicionadas con medio y sin medio.	57
6.15	Producción de CO ₂ en la fermentación de pulpa de café adicionada con diferentes proporciones de medio.	58
6.16	Comportamiento del lnCO ₂ con respecto al tiempo, en la fermentación de pulpa de café adicionada con diferentes proporciones de medio.	59
6.17	Actividad enzimática utilizando como sustrato metil ferulato.	61
6.18	Actividad enzimática FAE utilizando como sustrato etil ferulato.	61
6.19	Producción de CO ₂ con respecto al tiempo de la FMS con el medio seleccionado.	62
6.20	Estimación de la tasa específica respectiva (μ_{CO_2}) con respecto al tiempo de la FMS con el medio seleccionado.	63
6.21	Variación de la humedad y actividad de agua durante el cultivo en medio sólido de <i>Aspergillus tamarisii</i> V12307 cultivada en pulpa de café adicionada con medio (Asther <i>et al.</i> , 2002).	63
6.22	Variación de azúcares totales durante el cultivo en medio sólido de <i>Aspergillus tamarisii</i> V12307 cultivada en pulpa de café adicionada con medio (Asther <i>et al.</i> , 2002).	64
6.23	Análisis de actividad enzimática con extractos a diferentes tiempos de fermentación.	65
6.24	Actividad enzimática a diferentes tiempos de reacción con metil ferulato.	65

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AEC: Área equivalente de la colonia

AEH: Área equivalente del halo

AF: Ácido ferúlico

AFAE: Actividad feruloil esterasa

AH: Ácidos hidroxicinámicos

ANOVA: Análisis de varianza

CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

FAE: Feruloil esterasa (Ferulic Acid Esterase)

FMS: Fermentación en medio sólido

GC: Cromatografía de gases (Gas Chromatography)

HTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta presión (High Pressure Liquid Chromatography)

MSR: Metodología de superficie de respuesta

MOPS: Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

PDA: Agar Papa Dextrosa

PC : Pulpa de café

UAM-IRD: Universidad Autónoma Metropolitana-Institut de Recherche pour le Développement

MSI : Materia seca inerte

μ_{CO_2} : Tasa específica de producción de CO₂

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Este trabajo tuvo como propósito producir y caracterización un extracto enzimático con actividad feruloil esterasa y pectinasa a partir de un hongo filamentoso por fermentación en medio sólido utilizando como sustrato pulpa de café.

A partir de una colección de 13 hongos filamentosos, pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, se seleccionó a la cepa de *Aspergillus tamaris* V12307 por su capacidad para producir enzimas con actividad feruloil esterasa y pectinasa, dichas actividades fueron determinadas por metodologías basadas en la formación de halos de hidrólisis. Por análisis morfológico y por secuenciación se determinó el género y especie de *A. tamaris*. Con este microorganismo se estudió la producción de actividad feruloil esterasa utilizando como sustrato pulpa de café, tratada con disolventes para eliminar los ácidos hidroxicinámicos libres (en particular ácido caféico y *p*-cumárico), los cuales disminuyen la producción de la enzima feruloil esterasa (FAE). Con una mezcla metanol-agua (80:20), se estudió el efecto del tiempo y la temperatura sobre la extracción de los ácidos hidroxicinámicos libres, para ello se utilizó un diseño factorial compuesto con punto central. La cuantificación de los ácidos hidroxicinámicos se realizó por HPLC. Se usó la metodología de superficie de respuesta y análisis de regresión para optimizar las condiciones de extracción, las cuales fueron a 34 minutos y 56 °C. En estas condiciones se lograron obtener 77.1 mg de ácido clorogénico, 9.08 mg de ácido caféico, 3.10 mg de ácido *p*-cumárico y 2.74 mg de ácido ferúlico por Kg de pulpa de café seca. Estos valores corresponden a los ácidos hidroxicinámicos libres de la pulpa de café. Además se solubilizaron 5.63 g de hexosas/Kg de PC seca determinadas por el método de fenol sulfúrico.

Por otra parte, el crecimiento de *Aspergillus tamaris* V12307 se siguió mediante la producción de CO₂ durante la fermentación, utilizando columnas de vidrio empacadas. La actividad enzimática de los extractos fue analizada de dos maneras: a) Cromatografía en capa fina y b) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC); en ambas técnicas se confirmó la presencia de actividad feruloil esterasa. Adicionalmente, la producción enzimática se llevó a cabo en fermentación en medio sólido utilizando como sustrato pulpa de café tratada y adicionada con diferentes proporciones de un medio de cultivo que contiene maltosa y

reportado para la producción de la enzima feruloil esterasa en pulpa de remolacha azucarera por Asther *et al.*, 2002. En estos estudios se observó que la adición de medio de cultivo a la pulpa de café incrementó la velocidad específica de crecimiento (μ_{CO_2}) y disminuyó el tiempo de germinación. Las condiciones de cultivo que favorecieron la producción de actividad enzimática fueron obtenidas al utilizar una proporción de medio de cultivo al 50%, incubando a 30 °C durante 36 horas con una humedad del 65%. Se obtuvieron actividades enzimáticas de 14.0 y 11.5 nkatal/g materia seca fermentada al utilizar como sustratos metil ferulato y etil ferulato, respectivamente. Estos resultados fueron mayores a los reportados por Asther *et al.* (2002) usando metil ferulato como sustrato de reacción y pulpa de remolacha como sustrato de producción de feruloil esterasas. Por otra parte, se realizó un análisis cinético para la producción de la enzima en las condiciones seleccionadas, obteniendo que la mayor producción de la actividad de la enzima fue de 12 nkatal/gMS y la productividad de 7 nkatal/gMS día en 36 horas de cultivo. Mientras en el caso Asther *et al.*, (2002) la productividad fue de 1.25 nkatal/gMS día.

Los resultados de este trabajo mostraron el potencial de usar la pulpa de café como sustrato para la producción de enzimas tipo FAE que degradan la pared celular y podrían liberar ácidos hidroxicinámicos esterificados a los azúcares de la pared celular. De esta forma, la PC podrá ser empleada para la producción de compuestos de alto valor agregado con actividad antioxidante o que pueden ser precursores de aromas.

ABSTRACT

The aim of this work was to produce an enzymatic extract with feruloyl esterase and pectinase activities from a filamentous fungus by solid substrate fermentation using coffee pulp as substrate.

A collection of 13 filamentous fungi was screened, most of the strains belong to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*, a strain of *Aspergillus tamarii* V12307 was selected for its ability to produce feruloyl esterase and pectinase enzymatic activity, and such activities were determined by methodologies based on hydrolysis halos formation. Morphological analysis and sequencing indicated that this strain belongs to the genus *Aspergillus*. Feruloyl esterase production was studied using coffee pulp as substrate, previously treated with solvents to remove free-hydroxycinnamic acids (caffeic and *p*-coumaric acid, particularly), which decrease feruloyl acid esterase (FAE) production. A methanol-water mixture (80:20, v/v) was studied to optimize the effect of time and temperature on extraction of free-hydroxycinnamic acids. For this purpose a central composite design was used. Hydroxycinnamic acid quantifications were determined by HPLC. A response surface methodology and analysis regression were used to optimize extraction conditions, which were established at 34 minutes and 56 ° C. These conditions allowed extracting 77.1 mg of chlorogenic acid, 9.08 mg of caffeic acid, 3.10 mg of *p*-coumaric acid and 2.74 mg of ferulic acid per kg of dried coffee pulp. In addition, 5.68 g of soluble hexoses/kg dry PC were determined by phenol-sulphuric method. These values corresponded to free-hydroxycinnamic acids of coffee pulp.

Moreover, *Aspergillus tamarii* V12307 growth was monitored by CO₂ production during fermentation, using packed glass columns. Enzymatic activity of extracts was determined by two techniques: a) Thin layer chromatography and b) High performance liquid chromatography (HPLC); both techniques confirmed the presence of feruloyl esterase activity. Additionally, enzymatic production was carried out in solid substrate fermentation using extracted coffee pulp as substrate and added with different proportions of a culture medium containing maltose and reported for feruloyl esterase production in sugar beet pulp by Asther *et al.*, 2002. These studies found that adding culture medium to coffee pulp, the specific growth rate (μ_{CO_2}) was increased and germination time was decreased. Culture conditions that enhanced enzymatic activity

production were obtained by using a proportion of culture medium at 50%, incubated at 30 ° C for 36 hours with a moisture content of 65%. Enzymatic activities were 14.0 and 11.5 nkatal/g dried fermented material when methyl ferulate and ethyl ferulate were used as substrates, respectively. These results were higher than those reported by Asther *et al.* (2002) using methyl ferulate as reaction substrate and beet pulp as a substrate production of feruloyl esterases. Furthermore, a kinetic analysis carried out to produce the enzyme in selected conditions, the higher enzyme activity was 12 nkatal/g dry matter and productivity was 7 nkatal/g dry matter/day at 36 hours of cultivation. While in case of Asther *et al.*, (2002) productivity was 1.25 nkatal/g dry matter/day.

Results of this work showed the potential of using coffee pulp as substrate for feruloyl esterases production. This enzyme degrades cell wall and could release esterified hydroxycinnamic acids cell wall. In this way, coffee pulp can be used to produce fine chemicals that have antioxidant capacity or could be aroma precursors.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años las enzimas de origen microbiano han sido de gran importancia en los procesos industriales, éstas deben ser eficientes y resistentes a las condiciones de operación; por esta razón es necesario tener especial cuidado en la selección de los microorganismos potencialmente útiles. (Rojas, 2004). Las especies de *Aspergillus* son productores de enzimas que degradan la pared celular de plantas como celulasas, hemicelulasas y pectinasas, aunque también algunas pueden producir feruloil esterases, FAE, en inglés *Ferulic Acid Esterase* (Bonnin *et al.*, 2002). Estas enzimas son una subclase de las ácido carboxil esterases (EC 3.1.1.73) que catalizan la hidrólisis del enlace éster entre los ácidos hidroxicinámicos (AH) y los polisacáridos de la pared celular de las plantas (Faulds y Williamson, 1995). Estos AH se encuentran en numerosas plantas y subproductos agro-industriales en cantidades significativas, esto origina que se le considere a estos materiales como una fuente potencial de ácidos fenólicos de alto valor agregado con usos prometedores para la industria de los alimentos y farmacéutica (Benoit *et al.*, 2006).

En nuestro país, el tratamiento adecuado de los residuos agro-industriales puede evitar problemas fuertes de contaminación. Uno de estos residuos es la pulpa de café (PC), de la cual en México se generan aproximadamente 100,000 toneladas por año y por lo general no tiene un uso económico pues los cafecultores lo esparcen sobre terrenos para su descomposición (Salmones *et al.*, 2005). Algunos estudios reportan la utilización de procesos por fermentación en medio sólido (FMS) como método para mejorar el valor nutritivo de la PC (Peñaloza *et al.*, 1985). Se han encontrado algunas aplicaciones para este sustrato como son los ensilados, producción de enzimas y eliminación de sustancias antinutritivas y tóxicas (Gaime-Perraud *et al.*, 1993; Brand *et al.*, 2000; Ulloa *et al.*, 2003). En este tipo de fermentación los residuos son utilizados como soporte y fuente de carbono-energía obteniéndose productos de alto valor agregado (Pandey *et al.*, 2000a). Además, se ha encontrado actividad feruloil esterasa (AFAE) en *A. niger* crecido sobre PC, actividad que libera ácidos fenólicos como el ácido ferúlico (AF), *p*-coúmarico y caféico, compuestos de importancia para la industria (Benoit *et al.*, 2006), lo cual se traduce en un beneficio para el aprovechamiento de la PC.

En este trabajo se presenta un estudio orientado a la búsqueda de la producción de enzimas con AFAE a partir de hongos filamentosos por FMS utilizando PC. En el capítulo de Análisis Bibliográfico, se describen los AH y la estructura de la pared celular de las plantas, la enzima FAE, la PC, así como las características de la FMS. También se incluyen reportes relacionados a la producción de FA en este sistema de cultivo y el contenido de AH en PC. En el capítulo de Materiales y Métodos se detalla la metodología empleada para la extracción selectiva de AH no esterificados, la selección del hongo y la producción de enzimas hemicelulíticas por FMS, aunando a esto se detallan las técnicas analíticas empleadas. Los Resultados y Discusión, inician con los resultados obtenidos de la extracción selectiva de AH para el pretratamiento de la PC, determinando el disolvente a utilizar, así como se describe el estudio del efecto de las variables de tiempo y temperatura sobre la concentración de AH extraídos usando la metodología de superficie de respuesta (MSR) utilizando un diseño factorial compuesto con punto central. A partir del hongo seleccionado *Aspergillus tamaritii* V12307, de un total de 13 cepas de hongos filamentosos, se encontró que ésta presentaba AFAE y actividad pectinasa. Por último, se llevó a cabo la producción de un extracto enzimático a partir de esta cepa por FMS en PC determinando las condiciones de cultivo que favorecen la actividad enzimática de interés. Finalmente, las Conclusiones Generales y Perspectivas que se derivan de los resultados de este trabajo se presentan en el capítulo siguiente, finalizando con las Referencias consultadas y los Anexos.

ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

CAPÍTULO 2

2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

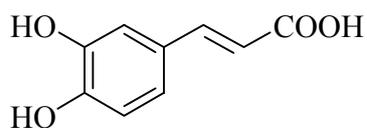
En este capítulo se presenta el análisis bibliográfico relacionado con los AH, su estructura, importancia industrial y su distribución en la pared celular vegetal. Por otra parte, se recopila información sobre las enzimas FAE capaces de liberar estos compuestos, a partir de la pared celular vegetal y la producción enzimática por microorganismos utilizando sistemas de cultivo sumergido o sólido describiendo la importancia de éste último, y finalmente se presentan los antecedentes directos de este trabajo.

2.1 Ácidos hidroxicinámicos

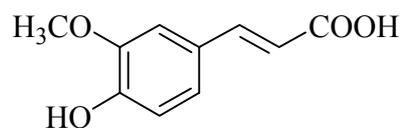
Los AH constituyen un amplio grupo de sustancias químicas considerados metabolitos secundarios de las plantas (Waterman y Mole, 1994). La distribución de estos compuestos en los tejidos y células vegetales varían considerablemente situándose en el interior de las células o en la pared (Martínez-Valverde *et al.*, 2000). Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos para el crecimiento y reproducción de las plantas, y además participan como agentes protectores frente a la acción de patógenos como parte de su mecanismo de defensa (Sancho *et al.*, 2001).

2.1.1 Estructura química

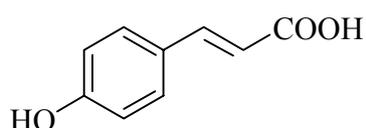
Los AH pertenecen al grupo de compuestos fenólicos simples (C_6-C_3) que tienen un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo (OH). Algunos ejemplos pueden ser los siguientes (Figura 1.1): Ácido caféico (3,4-dihidroxicinámico), AF (4-hidroxi-3-metoxicinámico), ácido *p*-cumárico (4-hidroxicinámico), ácido sináptico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico) y ácido clorogénico (5 cafeoil quínico). Estos compuestos raramente se encuentran libres en la naturaleza ya que se encuentran presentes en forma de derivados. Así por ejemplo, el ácido caféico se encuentra esterificado con el ácido quínico formando los ácidos clorogénico: isoclorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).



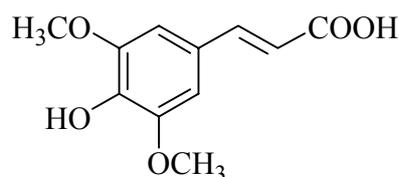
Ácido cafêico



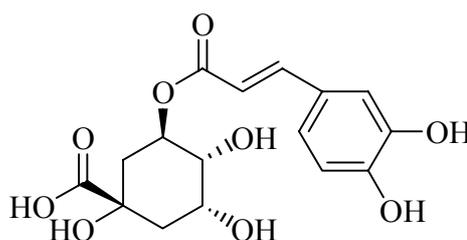
Ácido ferúlico



Ácido p-cumárico



Ácido sináptico



Ácido clorogénico

Figura 1.1 Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos.

Los AH pueden estar ligados a la pared celular por uniones éster o éter, tal es el caso del AF y ácido *p*-cumárico que han sido encontrados en la pared celular de muchas especies de plantas (Faulds y Williamson, 1999a).

2.1.2 Importancia a nivel industrial

La actividad de estos compuestos como antioxidantes y precursores de aromas está ampliamente reportada, lo que ha promovido estudios en extractos de plantas y su producción por microorganismos. De esta manera, los AH tienen un especial interés para la industria

alimentaria, cosmetológica y farmacéutica; por lo cual se justifica su aislamiento y producción por diferentes procesos químicos o biotecnológicos (Bonilla *et al.*, 1999). Estos se usan también para prolongar la vida útil de los productos alimenticios protegiéndolos frente al deterioro oxidativo y sus posibles efectos benéficos en humanos y animales. Estudios recientes sugieren que el consumo regular de alimentos con estos compuestos reduce el riesgo de enfermedades crónicas asociadas al daño oxidativo, como son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Gallardo *et al.*, 2006). Dentro de estos compuestos, el AF puede ser convertido enzimáticamente a vainillina, un aroma de importancia industrial (De Vries y Visser, 1999). También puede ser utilizado como antioxidante ya que posee actividad sobre el peroxinitrito y oxida lipoproteínas de baja densidad *in vitro* (Schroeter *et al.*, 2000). Además, está reportado que es un absorbente de luz UV y es utilizado como ingrediente activo en lociones para la piel y bloqueadores solares (Saija *et al.*, 1999).

2.2 Distribución en la pared celular vegetal

Los AH se encuentran ligados covalentemente a los polisacáridos de la pared celular vegetal y en forma soluble están en el citoplasma, siendo el más abundante el AF (Naczki y Shahidi, 2004). Su distribución en la pared celular vegetal depende del tipo de estructura celular de la planta (Ishii, 1997).

2.2.1 Estructura de la pared celular vegetal

La pared celular vegetal está constituida por polisacáridos que son los compuestos orgánicos más abundantes encontrados en la naturaleza y constituyen el 90% de la pared celular, estos se dividen en tres grupos: celulosa, hemicelulosa y pectina. La celulosa representa el componente principal de los polisacáridos de la pared celular y consiste en un polímero lineal de los residuos del enlace β -1,4-glucosídico. Los polímeros de la celulosa se presentan como estructuras ordenadas (fibras) y su función principal es asegurar la rigidez de la pared de la célula de la planta (De Vries y Visser, 2001).

Otro grupo de heteropolisacáridos son las pectinas, las cuales consisten de una sucesión de enlaces α -1,4 de residuos de ácido *D*-galacturónico (Figura 1.2). En las pectinas de

remolacha y manzana, el AF se presenta como residuo terminal unido a residuos de arabinosa en posición *O*-5 y de residuos de galactosa en *O*-2 (De Vries y Visser, 2001).

De esta manera, la hemicelulosa, pectina y lignina actúan como fibrillas de polímero creando una estructura rígida que consolida la pared de la célula de la planta. También forman los enlaces covalentes que se cree están implicados en la limitación del crecimiento de la célula y la reducción de la biodegradabilidad de la pared celular. Hay dos tipos de enlaces covalentes que se han identificado entre los polisacáridos y la lignina: Los puentes de ácido diferúlico. Un segundo tipo, es el enlace éster entre la lignina y el ácido glucurónico unidos a moléculas de xilano. Recientemente, se ha identificado un tercer tipo de enlace que está implicado en la unión de la pectina y glucuronoarabinoxilano al xiloglucano (De Vries y Visser, 2001).

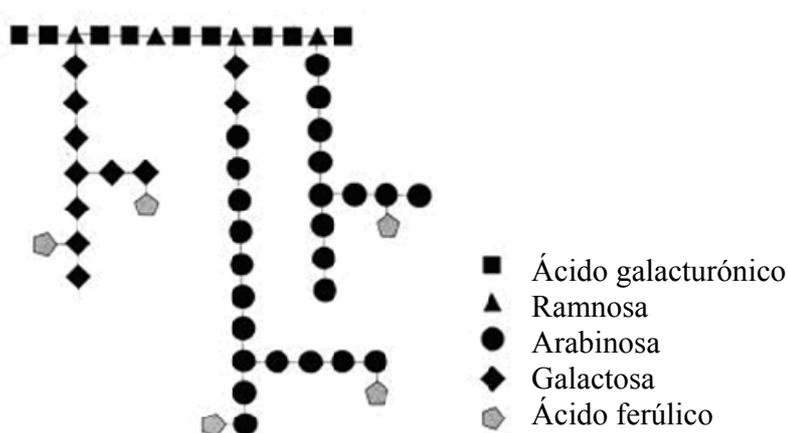


Figura 1.2 Representación esquemática de la región espacial de la pectina (De Vries y Visser, 2001).

Por otra parte, la celulosa está formada de cadenas lineales de glucosa enlazadas por puentes de hidrógeno formados entre los grupos hidroxilo de las distintas cadenas de glucosa yuxtapuestas formando estructuras cristalinas llamadas microfibrillas (Figura 1.3). Estas consisten hasta de 250 monómeros de glucosa y están enlazados por hemicelulosas. Además de esta estructura cristalina, la celulosa contiene regiones no cristalinas (amorfás) dentro de las

microfibrillas y las cantidades relativas de celulosa cristalina y no cristalina varían dependiendo de su origen (<http://www.biologia.edu.ar>).

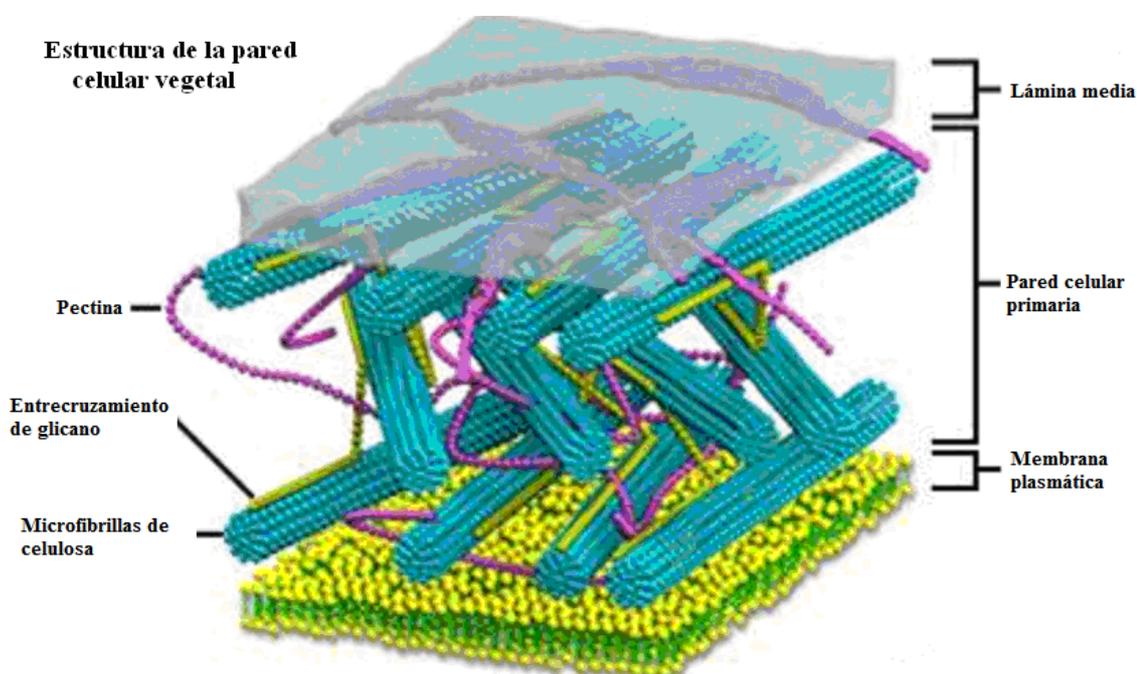


Figura 1.3 Estructura de la pared celular y las microfibrillas de celulosa (<http://www.biologia.edu.ar>).

2.2.2 El ácido ferúlico y sus dímeros en la pared celular vegetal

Uno de los enlaces más importantes en la pared celular de las plantas es la unión de dos moléculas de AF a cadenas adyacentes de polímeros. El AF se puede enlazar a las fracciones de hemicelulosa y de pectina de la pared celular de la planta y es capaz de enlazar estos polisacáridos así como a la lignina compuesta de polímeros aromáticos formando puentes de ácido diferúlico (Figura 1.4). Esta estructura entrelazada aumenta la rigidez de la pared de la célula. También se ha sugerido que estas uniones intervienen en la prevención de la biodegradabilidad de la pared celular por microorganismos (Grabber *et al.*, 1998). En *Avena sativa* se ha visto que durante el crecimiento se forman las cadenas de polisacáridos y lignina en la pared celular y durante el cese del crecimiento se relaciona la aparición de uniones covalentes entre estas las cadenas de polímeros con los dímeros de ferulato (Williamson *et al.*, 1998a).

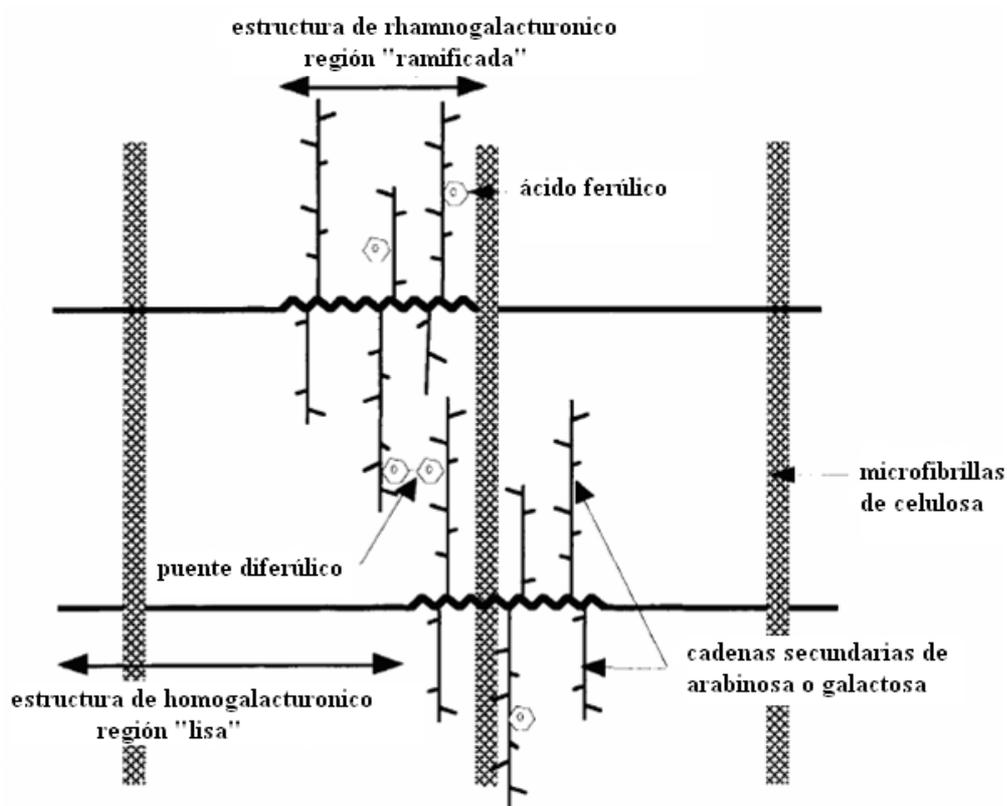


Figura 1.4 Modelo de la pared celular de la remolacha azucarera mostrando al ácido ferúlico y diferúlico (Saulnier y Thibault, 1999).

Los dímeros del AF se forman por diferentes tipos de uniones y se representan en la Figura 1.5. En maíz y pulpa de remolacha azucarera se ha reportado un contenido de diferulatos del 2.5% y 0.17%, respectivamente (Saulnier y Thibault, 1999).

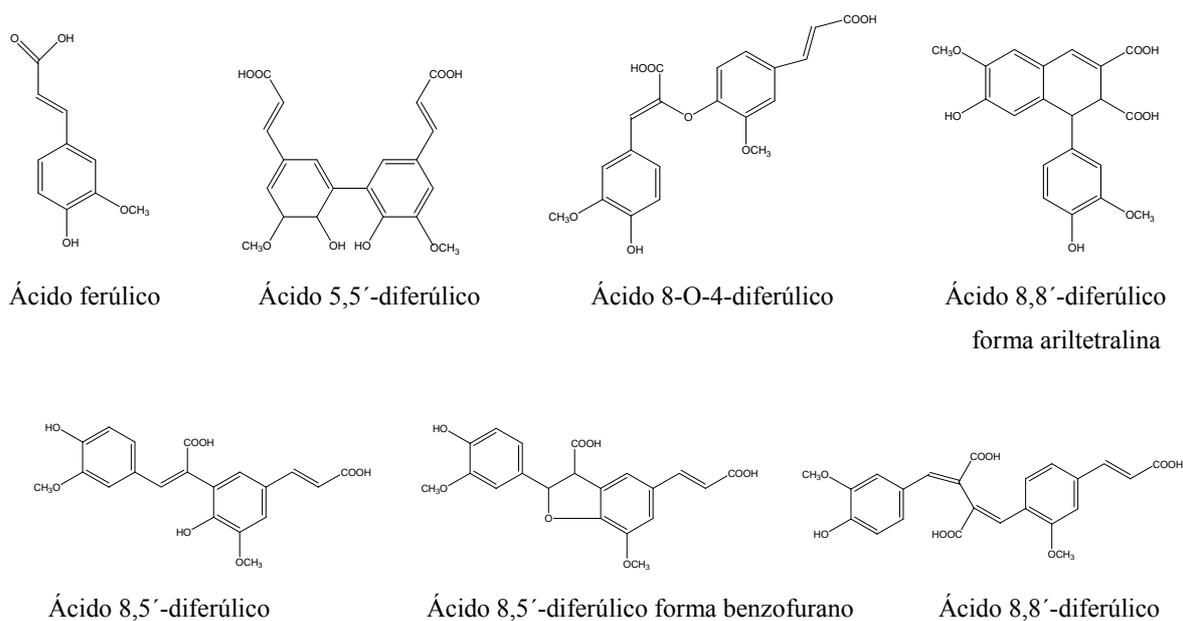


Figura 1.5 Ácido ferúlico y sus dímeros (De Vries y Visser, 2001).

En la pared celular, una fracción del AF está presente como dihidrodímeros (Figura 1.5), su función es formar puentes entre los polímeros de xilano o pectina permitiendo fortalecer la pared (Iiyama *et al.*, 1994). Varias estructuras diméricas han sido identificadas en hierbas, castaña china de agua y remolacha (Faulds y Williamson, 1999a).

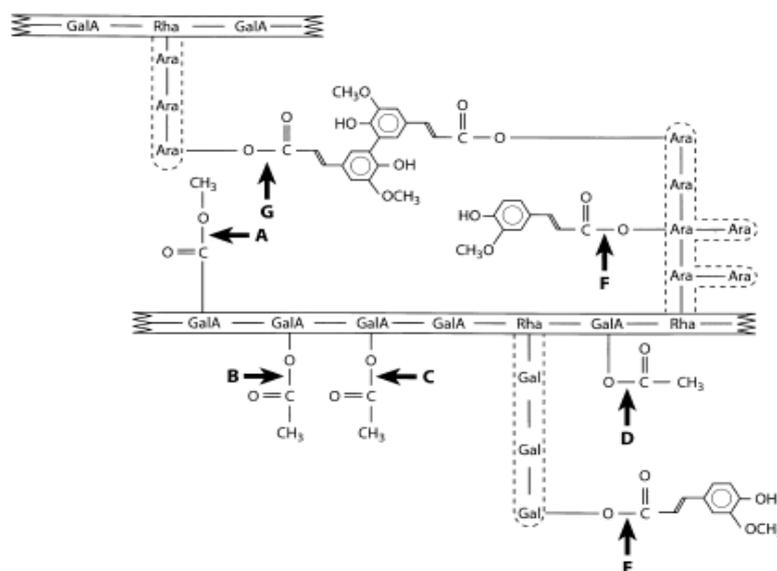


Figura 1.6 Esquema de la estructura de la pared celular representando al polímero unido formando puentes con dimeros de ácido ferúlico. a) Metil ésteres, b) grupos 2-O-acetil, c) grupos 3-O-acetil d) grupos acetil, unidos al ácido galacturónico, e) grupos feruloil unidos al C-6 de residuos de galactosil, f) grupos feruloil, g) grupos diferuloil unidos al C-2 de la arabinosa (Williamson *et al.*, 1998b).

Como se ha mencionado anteriormente, el tipo de planta de donde proviene la célula vegetal influye en la distribución de los AH; de esta manera se ha visto que en varios trabajos se ha clasificado a los sustratos de acuerdo al tipo de planta del que provienen, éstas pueden ser monocotiledóneas o dicotiledóneas, y sus características se describen a continuación.

2.2.3 En monocotiledóneas

De acuerdo al tipo de planta se forman las angiospermas, nombre del filo (o división) integrado por raíz, tallo, hojas y flores que llegarán a ser frutos. Éstas constituyen la forma de vida vegetal dominante en la Tierra, en casi todos los nichos ecológicos vamos a localizar plantas con flores. A su vez se han clasificado como monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las monocotiledóneas son las angiospermas que tienen la semilla en un cotiledón u hoja embrionaria. Las partes de su flor aparecen, generalmente, en múltiplos de tres, y sus hojas son

delgadas. En el tallo hay tejidos vasculares dispersos por lo que hay ausencia de crecimiento secundario, es decir, no crecen mucho a lo ancho. Su xilema y floema no producen tejido leñoso por lo que la mayoría son herbáceas. Las monocotiledóneas son más recientes y se cree que evolucionaron a partir de un grupo primitivo de dicotiledóneas.

Los AH de cereales y plantas como el bambú, caña de azúcar, trigo y maíz están esterificados con las arabinofuranosas. El más abundante es el AF, que está usualmente esterificado, en la posición *O*-5, a las cadenas *L*-arabinofuranosil en los arabinoxilanos; en la posición *O*-6, a los residuos β -D-galactopiranosil en los pectin ramno-galacturonanos; y en la posición *O*-4, a residuos α -D-xilopiranosil en los xiloglucanos. El AF constituye cerca del 0.66 % (p/p, peso seco) en salvado de trigo, 1.24 % en pajilla de trigo, 3.1 % en salvado de maíz, 0.9% en la pared celular del endospermo del arroz, 0.14% en granos de cebada, 0.32% en granos de malta, 2.2 a 3.8 % en cascarilla de avena y 1.4% cascarilla de cebada. El ácido *p*-cumárico se encuentra en cantidades importantes en salvado de maíz y pajilla de trigo, 0.33% y 0.66%, respectivamente (Faulds y Williamson, 1999a; Topakas *et al.*, 2007).

2.2.4 En dicotiledóneas

Por su parte las dicotiledóneas, que pueden ser plantas herbáceas o leñosas, y se caracterizan por presentar un embrión con 2 cotiledones. En sus tallos, el tejido vascular se dispone en anillos lo que da un mayor crecimiento al ancho de la planta. En éstas, las partes de la flor se encuentran en múltiplos de cuatro o cinco y sus pétalos son grandes y de color.

En dicotiledóneas como las espinacas y remolacha azucarera, el AF está esterificado en la posición *O*-2 a los residuos de α -*L*-arabinofuranosil, en los arabinanos; y en la posición *O*-6 está unido a los residuos β -galactopiranosil en los pectin ramnogalacturonanos. Se ha reportado que el contenido de AF en pulpa de remolacha azucarera (es de aproximadamente 1%, peso seco). Por otra parte, el café se encuentra clasificado dentro de las dicotiledóneas (Faulds y Williamson, 1999b) y está reportado que en PC hay 0.24 mg AF/g materia seca, determinado después de una hidrólisis alcalina (Benoit *et al.*, 2006).

2.3 Feruloil esterasas

Las FAE rompen la unión éster de polisacáridos con ferulatos en forma de monómeros o dímeros (Figura 1.6). Estas enzimas liberan el AF y diferúlico a partir de la hemicelulosa y pectina de la pared celular de las plantas. Se ha encontrado que la catálisis de las lipasas y las esterasas son reacciones químicamente similares (Aliwan *et al.*, 1999).

2.3.1 Clasificación

La mayor parte las FAE no son capaces de liberar por si solas el AF a partir del material polimérico de la pared celular (Kroon *et al.*, 1999). Las esterasas actúan sinérgicamente con otras enzimas hidrolíticas para facilitar la completa degradación de la pared celular de las plantas (hemicelulasas, xilanasas, pectinasas). Entre las esterasas, hay particular interés por las feruloil (EC 3.1.1.73) y cinamoil esterasas (EC 3.1.1.1), que pertenecen a una subclase de hidrolasas de éster carboxílico que hidrolizan la unión éster entre los ácidos cinámicos y los azúcares (Williamson *et al.*, 1998b).

Las FAE se han clasificado en cuatro grupos (A, B, C y D), de acuerdo a su especificidad sobre el AF y sus dímeros, el tipo de sustituciones que llevan a cabo sobre el anillo fenólico y por la identidad de la secuencia de aminoácidos de las enzimas (Crepin *et al.*, 2004). La nomenclatura de estas enzimas depende de la fuente y del grupo, tal es el caso de la FAE cuya fuente es un *Sporotrichum thermophile* de tipo C, al cual se le nombra StFae C, Fae es la abreviatura la FAE (Topakas *et al.*, 2005). Para distinguir las FAE se observó el tipo de afinidad hacia los oligosacáridos feruloilados y la posición de la feruloilación *L*-arabinofuranosa, tales enzimas fueron obtenidas por digestión enzimática en materiales como salvado de maíz y remolacha azucarera y por hidrólisis ácida del salvado de trigo y hojas de maíz (Biely *et al.*, 2002).

Una de las FAE más estudiada es la A (FAEA o FAE III) producida por *A. niger*, la cual tiene una alta especificidad por los enlaces éster, atacando la posición C-5 de la arabinosa pero siendo inactiva para los enlaces éster de la posición C-2. Otros factores que pueden afectar la especificidad por el sustrato son los cambios en los sustituyentes de los anillos aromáticos o en

el tipo de residuo de azúcar (McAuley *et al.*, 2004). En la Tabla 1.1, se presentan los diferentes tipos de FAE.

Tabla 1.1 Clasificación propuesta para las feruloil esterasas basado en su secuencia y especificidad por el sustrato (Hermoso *et al.*, 2004).

Tipo de FAE	A	B	C	D
Ejemplos	<i>A. niger</i> FaeA	<i>P. funiculosum</i> Fae B <i>N. crassa</i> Fae-1	<i>A. niger</i> FaeB <i>T. stipitatus</i> FaeC	<i>P. equi</i> EstA <i>C. japonicus</i> XYI
Fuente de inducción	Salvado de trigo/ Xilano de avena	Remolacha azucarera	Salvado de trigo/Remolacha azucarera	Salvado de trigo
Hidrólisis de los ésteres	MFA, MSA, MpCA	MFA	MFA, MSA, MpCA, MCA	MFA, MSA, MpCA, MCA
Liberación de diferulatos libres de la pared celular de las plantas	5,5'-ácido diferúlico solamente	No	No	5,5'-ácido diferúlico solamente
Similitud en la secuencia	Lipasa	Acetil xilan esterase	Tanasa	Xilanasas

MFA, metil ferulato; MSA, metil sinapato; MCA, metil cafeato; MpCA, metil *p*-cumarato

2.3.2 Producción microbiana de las feruloil esterasas

La degradación de los polímeros de la pared celular requiere la participación de varias enzimas hidrolíticas (hemicelulasas, xilanasas, pectinasas y esterasas). Los hongos y las bacterias rompen la pared celular de las plantas con hemicelulasas pero también utilizan FAE para incrementar el acceso al interior de la célula (McAuley *et al.*, 2004). Estas enzimas ya han sido purificadas y caracterizadas, y se han obtenido de varios microorganismos (*Streptomyces olivochromogenes*, *Clostridium stercorarium*, *Aspergillus awamori* y *A. niger*), estas enzimas son extracelulares (Asther *et al.*, 2002), y se han producido en sistemas tanto de cultivo sumergido como de FMS.

1. En cultivo sumergido

La producción microbiana de las FAE ha ido en aumento y existen trabajos en los que se reporta su aislamiento en hongos y bacterias. Entre los hongos que han resultado más productores de FAE en cultivo líquido están especies del género *Aspergillus* como *A. flavipes* y *A. niger*. La cepa *A. niger* I-1472 produjo enzimas que degradan polisacáridos, así como estererasas que liberaron AF cuando fue cultivado en pulpa de remolacha de azúcar o en salvado de maíz (Asther *et al.*, 2002). La mayor parte de estas enzimas reportadas han sido obtenidas por cultivo en medio líquido. En la Tabla 1.2 se presentan en resumen los microorganismos reportados que producen FAE en cultivo sumergido.

Tabla 1.2 Microorganismos que producen FAE en cultivo sumergido (Topakas *et al.*, 2007).

Organismo	Fuente de carbono	Condiciones de cultivo	Actividad FAE	
			(mU/ml)	(mU/mg)
<i>Aspergillus awamori</i> IFO4033	2% WB	V=150 ml, 30 °C, 3 días	–	6900
<i>A. awamori</i> VTT-D- 71025	3% SFC	30 °C, 7 días	10	–
	3% WB	30 °C, 7 días	90	–
<i>A. flavipes</i>	1% WB	28 °C, 6 días	6820	10570
	1% MB	28 °C, 5 días	33180	6980
<i>A. foetidus</i> VTT-D- 71002	3% SFC	30 °C, 7 días	18	–
	3% WB	30 °C, 7 días	12	–
<i>A. niger</i>	20 mg/mL MFA	V=500 ml, 26 °C, 4 días	28	–
<i>A. niger</i> CBS 120.49	1% OSX + 0.1% glu	V=100 ml, 25 °C, 4 días	1250	130
	1% WB + 0.1% glu	V=100 ml, 25 °C, 3 días	–	340
	4% WB + 1% DSG	V=100 ml, 25 °C, 4 días	–	440
	1% OPP	V=100 ml, 25 °C, 4 días	–	10
	4% SBP	V=100 ml, 25 °C, 4 días	–	5
<i>A. niger</i> CS 180 (CMICC 298302)	1.5% SBP	V=2 l, 25 °C, 4.5 días	10.3	413

Tabla 1.2 Continuación...

Organismo	Fuente de carbono	Condiciones de cultivo	Actividad FAE	
			(mU/ml)	(mU/mg)
<i>A. niger</i> NRCC 401127	1% DSWB	V=1 l, 37 °C, 4 días	10580	132250
<i>A. oryzae</i> VTT-D-85248	3% WB	30 °C, 7 días	72	–
<i>A. phoenicis</i> IMI 211395	1% MFG + 0.5% glu	V=50 ml, 30 °C, 7 días	4000 ca.	–
<i>A. terreus</i> VTT-D-82209	3% SFC	30 °C, 7 días	24	–
	3% WB	30 °C, 7 días	60	–
<i>A. pullulans</i> NRRLY 2311-1	1% BX	V=2 l (bioreactor), 30 °C, 60 h	347.5	1600
<i>Bacillus subtilis</i> FMCC267	0.05% MFA	V=100 ml, 30 °C, 24 h, CFE	–	34.1 (MFA)
<i>Clostridium stercorarium</i> NCIMB 11754	0.5% BX	V=16 l, 65 °C	–	150
<i>Fusarium oxysporum</i> F3	2% CC	V=17 l, 30 °C, 70 h	98	–
<i>F. proliferatum</i> NRRL 26517	1% CB	V=100 ml, 30 °C, 5 días	33.46	–
<i>Lactobacillus acidophilus</i> IFO 13951	0.5% glu + 0.2% lac	V=1 l, 37 °C, 60 h	–	7
<i>Neocallimastix</i> MC-2	2% Cellulose (MN-300)	V=1.75 l, 39 °C, 5 días	–	55
	0.4% CBG	39 °C, 5 días	–	1040
<i>N. crassa</i> ST A (74 A)	2% WB	V=500 ml, 30 °C, 3 días	–	9000a ca.
	2% SBP	V=500 ml, 30 °C, 2 días	–	20000a ca.
<i>Orpinomyces</i> PC-1	0.4% CBG + 0.4% S	39 °C, 5 días	–	220
<i>Orpinomyces</i> PC-2	0.4% CBG + 0.4% S	39 °C, 5 días	–	360
<i>Orpinomyces</i> PC-3	0.4% CBG + 0.4% S	39 °C, 5 días	–	380
<i>Penicillium brevicompactum</i>	100 mg/mL MFA	V=500 ml, 26 °C, 4 días	32	–

Tabla 1.2 Continuación...

Organismo	Fuente de carbono	Condiciones de cultivo	Actividad FAE	
			(mU/ml)	(mU/mg)
<i>P. expansum</i>	100 mg/mL MFA	V=500 ml, 26 °C, 4 días	45	–
<i>P. funiculosum</i> IMI-134756	1% SBP	V=2 l, 25 °C, 6 días	120	–
<i>Piromyces</i> MC-1	0.4% CBG + 0.4% S	39 °C, 5 días	–	560
<i>Schizophyllum commune</i> ATCC 38548	1% DSWB	V=1 l, 30 °C, 14 días	7	41.2
	1% OSX	V=1 l, 30 °C, 14 días	2	9.5
	1% Celulosa	V=1 l, 30 °C, 14 días	28	28
	1% A	V=1 l, 30 °C, 12 días	1200	1300
<i>Streptomyces avermitilis</i> CECT 3339	1% DSWB	V=30 ml, 37 °C, 1–2 días	–	16.8
	1% BSG	V=30 ml, 37 °C, 1 día	56.1	653
	1% DSWB	37 °C, 1 día	–	750
<i>Streptomyces</i> C-248	1% DSWB	V=1 l, 37 °C, 3 días	80	300
<i>Streptomyces</i> C-254	1% DSWB	V=1 l, 37 °C, 3 días	130	380
<i>S. olivochromogenes</i> NRCC2258	1% DSWB	V=1 l, 37 °C, 3 días	1200	2350
	1% SCB	V=1 l, 37 °C, 3 días	830	1800
	1% OSX	V=1 l, 37 °C, 3 días	2560	6900
	1% DSWB	V=1 l, 37 °C, 4 días	1200	2970
<i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	1% MFG + 0.5% glu	V=50 ml, 30 °C, 7 días	3000 ca.	–

Abreviaturas:

V: volumen, OSX: Xilano de avena (oat spelt xylan), WB: salvado de trigo (wheat bran), SBP: pulpa de remolacha azucarera (sugar beet pulp), BSG: grano agotado de cervecería, Glu: glucosa, Lac: lactosa, A: avicel, DSWB: salvado de trigo libre de almidón (destarched wheat bran), SCB: bagazo de caña, SFC: flóculo de celulosa, celulose solka flocc, DSG: destilado de grano (distiller's spent grain), CBG: alimento para animales de las costas bermudas, S: sisal, BX: xilano de madera de abedul (birchwood xylan), MFG: forraje, meadow fescue grass, MB: salvado de trigo (maize bran), CB: salvado de maíz (corn bran), CC: mazorca de maíz (corn cobs), MFA: metil ferulato.
ca.: contenido aproximado

^aMejores condiciones seleccionadas para la producción de FAE

En un análisis realizado a la AFAE utilizando metil ferulato, se obtuvo un valor de 960 mU y tomando valor de 1.0, se observó que al adicionar AF y vainillínico se incrementó la actividad 1.2 y 1.5 veces, respectivamente. Con los otros ácidos fenólicos disminuye la actividad, especialmente el ácido caféico donde la actividad disminuyó a 0.49. Todos los ácidos fenólicos se adicionaron en una concentración de 0.3 mg/ml (Faulds *et al.*, 1997, Faulds y Williamson, 1999b,).

2. Fermentación en medio sólido

Para la producción de enzimas FAE se ha utilizado el cultivo de microorganismos en FMS resultando atractivo este sistema por muchas ventajas que presenta sobre el cultivo sumergido principalmente en el cultivo de hongos. En la Tabla 1.3 se presentan estudios realizados con microorganismos por FMS destacando la fuente de carbono utilizada, las condiciones de cultivo y el tipo de sustrato empleado utilizado en los ensayos de actividad enzimática.

La elección del sustrato es de gran importancia para la producción de FAE ya que no solo sirve como fuente de carbono y energía sino también se ha visto que proveen los compuestos de inducción necesarios para los microorganismos. Se han utilizado fuentes de carbono complejas como el salvado de maíz, salvado de trigo, pulpa de remolacha azucarera, etc., que contienen altas concentraciones de AF y han sido eficientes para la producción de FAE. Sin embargo, hasta ahora los estudios de inducción han sido escasos y no hay evidencia clara de que exista una correlación directa entre las especies de microorganismos y los patrones de inducción de la FAE (Topakas *et al.*, 2007).

Tabla 1.3 Microorganismos que producen feruloil esterasas en cultivo sólido (Topakas *et al.*, 2007).

Organismo	Fuente de carbono	Condiciones de cultivo	Ensayo	Actividad FAE	
				(mU/g)*	(mU/mg)
<i>Aspergillus niger</i>	33% WB (75 g)	26 °C, 7 días, Vextr = 400 ml	MFA/FAX/FAXX	4.5/3.2/3.6 ca.	–
	33% SBP (75g)	26 °C, 7 días, Vextr = 400 ml	MFA/FAX	0.9/0.4 ca.	–
<i>A. niger</i> I-1472	30% SBP	30 °C, 4 días, Vextr = 30 ml/5 g material seco	MFA/MSA	300/1170	–
	30% SBP	30 °C, 6 días, Vextr = 30 ml/5 g material seco	MCA/MpCA	576/720	–
<i>Penicillium brasilianum</i> IBT 20888	20% BSG (2.5 g)	30 °C, 196 h, Vextr = 10 ml/1 g material seco	MFA	1542	–
<i>P. brevicompactum</i>	33% WB (75 g)	26 °C, 7 días, Vextr = 400 ml	MFA/FAX/FA XX	9.4/6.3/7.6 ca.	–
	33% SBP (75 g)	26 °C, 7 días, Vextr = 400 ml	MFA/FAX	6.5/3.4 ca.	–
<i>P. expansum</i>	33% WB (75 g)	26 °C, 7 días, Vextr = 400 ml	MFA/FAX/FA XX	16.4/12.8/14.8 ca.	–
	33% SBP (75 g)	26 °C, 7 días, Vextr = 400 ml	MFA/FAX	10.3/5 ca.	–
<i>P. pinophilum</i> CMI 87160ii	33% (OSW + WB, 7:3) (150 g)	30 °C, 12 días, Vextr = 300 ml	MFA	–	80
<i>Sporotrichum thermophile</i> ATCC 34628	22% (500 g) WS	50 °C, 163 h, Vextr = 10 ml/1 g material seco	DSWB	156	–

Abreviaturas:

Vextr = Volumen de buffer para la extracción enzimática. WB: salvado de trigo (wheat bran), SBP: pulpa de remolacha azucarera (sugar beet pulp), WS: paja de trigo (wheat straw), BSG: granos de brewer (brewer's spent grain), DSWB: salvado de trigo libre de azúcares (destarched wheat bran), MFA: metil ferulato, MpCA: metil *p*-cumarato, MCA: metil cafeato, FAX: 2-*O*-[5-*O*-(transferuloil)-β-*L*-arabino-furanosil]-*D*-xilopiranosil, FAXX: *O*-[5-*O*-(trans-feruloil)-α-*L*-arabino-furanosil]-(1→3)-*O*-β-*D*-xilopiranosil-(1→4)-*D*-xilopiranosil.
ca.: contenido aproximado

*Actividad FAE expresada sobre peso seco.

2.4 Pulpa de café

La industria cafetalera procesa grandes cantidades del fruto de café y se generan elevados volúmenes de residuos agro-industriales tales como la PC (Ramírez-Martínez *et al.*, 2000). En México el procesado del fruto se realiza generalmente mediante el llamado “Beneficio Húmedo del Café”, donde se consume grandes cantidades de agua y casi el 80 % del fruto se considera de poco o nulo valor económico y por consiguiente es considerado como un residuo. La contaminación ocasionada por la industria cafetalera en el proceso de beneficio del café constituye un problema para los países productores del mismo. Sin embargo, los residuos sólidos que se generan contienen cantidades apreciables de lignina, celulosa, hemicelulosa, azúcares, Na^+ , K^+ , $\text{P}^{\pm 3}$, entre otros, lo que hace que a la PC se le pueda dar diversos usos en función de los fines propuestos por un determinado contexto social. El país procesa actualmente aproximadamente 64 mil toneladas del fruto del café por zafra cafetalera lo que representa, teniendo en cuenta el alto por ciento del fruto que no se utiliza, altos volúmenes de residuales sólidos generados y su uso se limita a la obtención de una pequeña cantidad de abono orgánico. Los desechos producidos por el beneficiado del café son potencialmente contaminantes, con frecuencia la PC es dispuesta en grandes montículos donde se dejan varios años hasta su total descomposición, sin obtener algún provecho de este subproducto, además de que representan una fuente importante de lixiviados. Se han realizado esfuerzos por utilizarla como abono orgánico, alimento para animales y como combustible (es capaz de producir hasta 4200 kilocalorías por kilogramo de peso). Sin embargo, en algunos casos se torna costoso su transporte y utilización, en el caso de usarse como combustible, la mayor parte de la humedad debe ser desplazada por métodos mecánicos así como por secado convencional (Bertrand y Rapidel, 1999). Asimismo este material ha sido utilizado en algunos estudios como soporte en medio sólido para la obtención de enzimas de interés comercial (Pandey *et al.*, 2000a).

La cereza de café está constituida por un exocarpo (piel), un mesocarpo externo (pulpa), un mesocarpo interno (mucílago) y un endocarpo fibroso (pergamino) que rodea al grano (Figura 1.7). La composición química de la PC varía de acuerdo a diferentes factores tales como: la variedad del cultivo, la composición del suelo, la etapa de madurez del fruto, las prácticas culturales y los tratamientos aplicados (Barreto-Castro, 2001). Este material representa

el más abundante desecho producido durante el despulpado del fruto de café, proceso que separa el grano del epicarpio (pulpa) y parte del mesocarpio o mucílago (Urbaneja *et al.*, 1997).

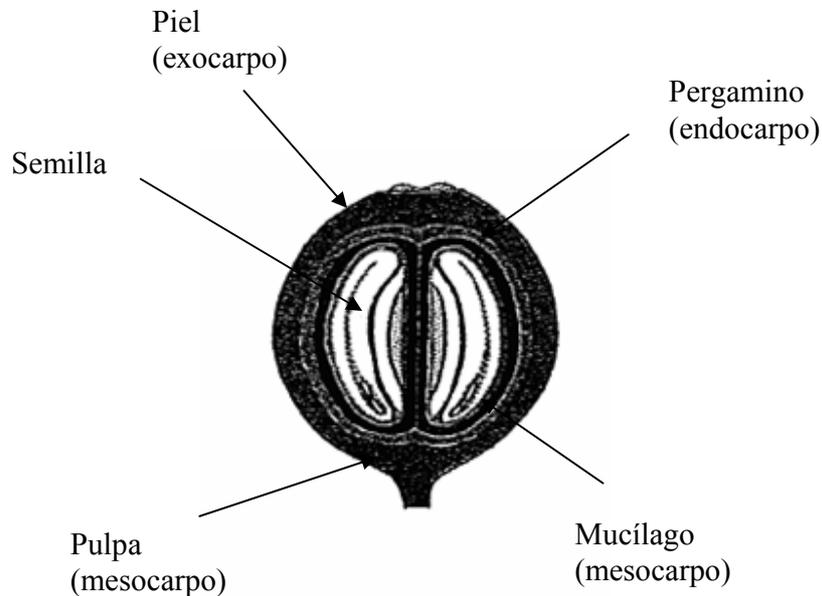


Figura 1.7 Corte longitudinal de la cereza de café (Avallone, 2001).

Fermentación en medio sólido

En numerosos reportes se describen las aplicaciones y las ventajas de la FMS en bioprocesos y para la producción de distintos productos de valor agregado. Se define como el tipo de fermentación que permite el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos húmedos en ausencia de flujo de agua libre (Pandey *et al.*, 2000b). El material sólido puede ser utilizado solo como soporte o como fuente de carbono-energía. Las principales ventajas de este tipo de fermentación es su bajo requerimiento de energía, bajo riesgo de contaminación, ausencia de maquinaria compleja y sistemas de control sofisticados de manera que se requieren pequeños fermentadores debido a la ausencia de agua libre. Sin embargo una desventaja es que el escalamiento industrial es más complicado por la remoción de calor que es el paso limitante (Pandey *et al.*, 2000 a). Para la producción de enzimas, la FMS incluye altos niveles de actividad enzimática y alta productividad, bajos niveles de represión catabólica y un incremento en la estabilidad de las enzimas excretadas (Viniestra *et al.*, 2003). De esta manera, con la FMS

se pueden incrementar la producción de enzimas tipo FAE que ayudarán a liberar el AF de la pared celular de la pulpa de café. Numerosos subproductos agrícolas han sido utilizados como sustratos incluyendo bagazo de caña, salvado y paja de avena y arroz, remolacha de azúcar y PC (Asther *et al.*, 2002).

2.6 Antecedentes directos

La liberación selectiva del AF debido a la acción de enzimas tipo FAE facilitan la recuperación de este producto de valor comercial (Laszlo *et al.*, 2006) a partir de la pared celular de residuos agro-industriales (Kroon y Williamson, 1999, Topakas *et al.*, 2003) por lo que es necesario saber el contenido de AH que es posible obtener de este material. En el grupo de trabajo del laboratorio se han realizado algunos estudios previos para tener información suficiente del contenido de estos compuestos. Ramírez-Coronel (2004) estudió el contenido de compuestos fenólicos en PC fresca y en pulpa secada al sol durante tres días obteniendo 37.9 y 32.6 g/Kg en peso seco de compuestos fenólicos, respectivamente, de los cuales el 52.7 % y 49 % representan a AH. Por otra parte, Ruiz (2002) evaluó el efecto de diferentes fuentes de carbono tipo cereal (xilano de avena, xilano de avena-ácido ferúlico, trigo sin salvado y salvado de trigo) y tipo pulpa (pulpa de remolacha azucarera, PC fresca y PC ensilada) sobre la producción de feruol, cafeol y *p*-cumarol esterasas por *Aspergillus awamori*. En el caso de la producción de FAE la mejor fuente de inductores fue la combinación xilano de avena (1.5 % p/v) y ácido ferúlico (0.03 % p/v).

Por otra parte, se desarrollaron trabajos con PC en los que se utilizaron bacterias lácticas para su conservación por ensilaje (Suzuki, 1999), se ha realizado también la selección de un hongo filamentoso con capacidad de degradar la cafeína en presencia de ácido tánico (Gutiérrez-Sánchez 2000). Además, se aplicó el producto ensilado y descafeinado de PC como complemento en dietas balanceadas para crías de tilapia *Oreochromis niloticus*, utilizando cepas seleccionadas de bacterias ácido lácticas y un hongo filamentoso, capaces de conservar los compuestos nutricionales de la pulpa y disminuir o eliminar los compuestos tóxicos (Barreto-Castro, 2001). El más reciente trabajo consistió en determinar las condiciones ambientales y de pre-tratamiento de la PC para la producción de esporas por FMS con una cepa de *Penicillium commune* a nivel semi-piloto (Nava-Villagómez, 2003)

JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a los antecedentes presentados se han observado la presencia de AH ligados a la pectina en la pared celular de la PC. Por otra parte se ha logrado obtener una mayor producción de enzimas FAE en FMS con residuos agro-industriales que en cultivo líquido. Además, se ha demostrado que los hongos filamentosos especialmente del género *Aspergillus* son los mejores productores de esta actividad enzimática (Bonnin *et al.*, 2002).

Esta investigación esta dirigida a seleccionar un hongo filamentoso capaz de producir enzimas tipo FAE y pectinasa por FMS utilizando como sustrato PC, cuya finalidad es que sea capaz de liberar AF entre otros AH. Es importante que el hongo seleccionado no sea patógeno ni esté asociado a la producción de toxinas, y de acuerdo a la FDA (*Food and Drug Administration*) se considera GRAS (*Generally Recognized as Safe*, Generalmente Reconocido como Seguro) a la enzima producida por un microorganismo GRAS. Se debe considerar también que en la PC se encuentran AH libres que inhiben en cierto grado la AFAE, por lo que es importante realizar un pre-tratamiento con disolventes de la PC.

De esta forma, el presente trabajo busca contribuir en el estudio de las enzimas del tipo FAE, las cuales fueron reportadas por primera vez por Mackenzie y Bilous (1988). Es en la última década cuando se ha logrado alcanzar una mayor importancia debido a que liberan los AH (AF, *p*-cumárico y caféico entre los más importantes) ligados a polímeros de la pared celular de las plantas. Esto implicaría la obtención de compuestos antioxidantes y precursores de aromas que podrían ser utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmetológica, esto implica que su valor comercial sea elevado y tengan alta demanda.

Este estudio propone una metodología valiosa para un uso adicional a residuos agroindustriales ricos en AH, con el objetivo de producir antioxidantes.

OBJETIVOS

CAPÍTULO 4

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Producir enzimas con actividad tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido utilizando como sustrato pulpa de café.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Establecer las condiciones de extracción selectivas para los ácidos hidroxicinámicos libres (ácidos caféico, *p*-cumárico, caféico y clorogénico) de la pulpa de café usando diferentes disolventes.
- 2) Caracterizar y seleccionar cepas de hongos filamentosos para producir enzimas tipo feruloil esterasa y pectinasa.
- 3) Establecer las condiciones ambientales y nutricionales para la producción de enzimas tipo feruloil esterasa en fermentación en medio sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 5

5. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presentan los microorganismos utilizados y la metodología para la preparación de la PC como sustrato para su uso en los cultivos. Además, se presentan los criterios de selección de hongos filamentosos productores de AFAE y actividad pectinasa, así como las condiciones de cultivo para la FMS del hongo seleccionado. Por último, se describen las técnicas analíticas para este estudio.

5.1 Material biológico

5.1.1 Origen de la cepa

Se utilizaron 12 cepas de hongos filamentosos obtenidos de la colección UAM-IRD (Universidad Autónoma Metropolitana-Institut de Recherche pour le Développement) y una cepa más del CINVESTAV (Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional). Los microorganismos se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1 Microorganismos utilizados en este estudio.

Cepa	Colección
C23B311	UAM-IRD
C16310	UAM-IRD
C23308	UAM-IRD
C17309	UAM-IRD
V12307	UAM-IRD
C28312	UAM-IRD
V33306	UAM-IRD
V26316	UAM-IRD
C11B315	UAM-IRD
<i>P. commune</i> V33A25	UAM-IRD
<i>A. niger</i> Aa20	UAM-IRD
<i>A. niger</i> C28B25	UAM-IRD
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	CINVESTAV

5.1.2 Propagación y conservación de las cepas

Las cepas de hongos se propagaron periódicamente en Agar Papa Dextrosa (PDA) utilizando matraces de 250 ml. Se recolectaron esporas utilizando Tween 80 (0.1%) de un cultivo anterior para obtener inóculo y se sembraron los matraces con medio de cultivo reciente, estos se incubaron a 30 °C. Para la conservación de las cepas en periodos cortos de tiempo se cultivaron sobre tubos inclinados con medio PDA conservándolos a 4 °C, y para periodos largos de tiempo se conservaron los cultivos en aceite mineral, se liofilizaron esporas utilizando como agente crioprotector leche descremada al 30%.

5.2 Reactivos químicos

Para este estudio se emplearon estándares de AH: Ácido clorogénico, ácido caféico, AF y ácido *p*-cumárico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), así como los compuestos metil ferulato (Extrasynthese, Lyon, France) y etilferulato (Sigma-Aldrich, USA). También se utilizó pectinasa de *Aspergillus niger* (Fluka, Sigma-Aldrich, USA) y pectina de manzana (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) como control positivo para análisis de halos de hidrólisis. Bacto Agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) se utilizaron en las pruebas de revelación de halos de hidrólisis.

5.3 Preparación de la pulpa de café

La PC fue tratada para su uso en los cultivos con la finalidad de mejorar la producción de la FAE, el procedimiento se describe a detalle a continuación.

5.3.1 Origen de la pulpa

La PC utilizada se obtuvo del “Beneficio de Café Finos” localizado en Coatepec, Veracruz. Este beneficio pertenece a la empresa “AGROINDUSTRIAS UNIDAS DE MÉXICO S.A. DE C.V” grupo que está incorporado al Consejo Regulador del Café en el Estado de Veracruz. La pulpa recolectada se obtuvo directamente del despulpado del beneficiado húmedo y debido al alto contenido de humedad tuvo que ser secada al sol durante seis días.

5.3.2 Tratamiento de la pulpa de café

La PC original se limpió manualmente de basuras propias del proceso del beneficiado (hojas, granos de café, ramas, etc.) quedando un material más homogéneo. Después se realizó la molienda del sustrato utilizando un molino manual para granos y se tamizó a un tamaño de malla entre 12 y 16. Posteriormente se almacenó en pequeñas porciones y se cubrió de la luz y humedad utilizando bolsas de plástico negras. Una vez preparado el material de esta manera, se determinó su humedad final ($8.91 + 0.21$ %, es decir 91.09 % de materia seca).

5.4 Extracción de ácidos hidroxicinámicos no esterificados

La pulpa de café preparada (limpiada, molida y tamizada) fue tratada con disolventes para extraer los AH no esterificados a la pared celular vegetal.

5.4.1 Extracción con diferentes mezclas de disolventes

Los disolventes elegidos para realizar la extracción fueron metanol y agua (Ramírez-Coronel *et al.*, 2004). Las extracciones se realizaron con las siguientes mezclas: Metanol 100%, metanol-agua (80:20, v/v) y metanol-agua (60:40, v/v), todas acidificadas con ácido acético al 0.5 %. A cada muestra (10 g de pulpa preparada) se le realizaron tres extracciones sucesivas agregando 100 ml de los disolventes. Cada extracción se realizó durante 20 minutos a 45 °C. Se tomaron 4 ml de cada extracto y se analizó por HPLC (High Performance Liquid Chromatography). El resto de los extractos se evaporó hasta un volumen de 5 ml. El extracto final fue congelado, liofilizado y pesado para calcular los rendimientos de extracción.

5.4.2 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

Una vez que se seleccionó la mezcla de los disolventes se planteó un análisis por diseño factorial para estudiar el efecto de los factores tiempo (X_1) y temperatura (X_2) sobre las extracciones de los AH libres. Al extracto obtenido de cada muestra se le evaporó el disolvente y después fue congelado y liofilizado, obteniendo el peso final para realizar cálculos de rendimientos. El material liofilizado se analizó por HPLC para determinar los AH no esterificados.

Diseño experimental

Se procedió de la siguiente manera: A muestras de 10 g de PC se les realizaron extracciones agregando 100 ml de solvente en las condiciones establecidas por el diseño experimental, como se indica en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2 Diseño factorial para la extracción de los ácidos hidroxicinámicos.

Niveles Reales		Niveles codificados	
Tiempo (min)	Temperatura (°C)	X ₁	X ₂
10	53	+1	+1
30	37	+1	-1
10	53	-1	+1
10	37	-1	-1
20	45	0	0
20	56.3	0	(2) ^{1/2}
20	33.7	0	-(2) ^{1/2}
34.4	45	(2) ^{1/2}	0
5.9	45	-(2) ^{1/2}	0

Superficies de respuesta. Para el análisis por MSR se aplicaron ecuaciones polinomiales del tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$$

Donde Y es la variable de respuesta que es la concentración del AH desesterificado extraído, en este caso en particular pueden ser los ácidos clorogénico, caféico, cumárico o ferúlico. β_0 es el término independiente; β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} y β_{12} son los coeficientes del modelo X₁ y X₂ son las variables independientes relacionadas a los factores y ε es el error del modelo (Montgomery, 1991).

Las regresiones y análisis de varianza (ANOVA) se realizaron para cada AH estudiado. Su significancia se evaluó con la prueba de Fisher (F) a un $P < 0.05$ y se obtuvieron los

coeficientes de determinación (R^2) para cada compuesto estudiado. La significancia de los coeficientes obtenidos de las regresiones fue evaluada por la prueba de student (t Student test) con un $P < 0.05$. Las regresiones y ANOVA fueron calculadas utilizando el software de *Excel* de *Microsoft*[®], y las superficies de respuesta fueron generadas utilizando el paquete estadístico de diseño de experimentos Fusion Pro version 6.7.0 (*S-MATRIX* corp., Eureka, CA, USA).

5.5 Análisis para selección de la cepa

El criterio de selección de las cepas de hongos filamentosos fue la producción de enzimas tipo FAE y pectinasa simultáneamente, para este propósito se recurrió a una técnica basada en la aparición de halos de hidrólisis (Donaghy y McKay, 1994).

5.5.1 Halos de hidrólisis de actividad feruloil esterasa

Para determinar la AFAE se utilizó un procedimiento simple que permite al hongo crecer en un medio en agar con un sustrato esterificado (etil ferulato) y al mismo tiempo detectar el rompimiento del enlace éster con la ayuda de un indicador sensible a los cambios de pH como el verde de bromocresol (Donaghy y McKay, 1994). Con este método fueron estudiadas las 13 cepas de hongos y una enzima comercial (pectinasa, Sigma Aldrich) utilizada como un control positivo (Donaghy y McKay, 1994). El ensayo se realizó en cajas de Petri utilizando como medio de cultivo Bacto Agar (Difco) al 1 % y una solución estándar al 5 % de etil ferulato (Sigma Aldrich) disuelto en etanol. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min y la adición del etil ferulato se realizó después de la esterilización utilizando un filtro de 0.22 μm evitando así el rompimiento del enlace éster. Al medio Bacto Agar (700 ml) se le adicionaron 10.5 ml de solución estándar de etil ferulato al 5 % y se mezcló con un agitador magnético, obteniendo una concentración final del ferulato del 1.5 %. Se utilizaron cajas de Petri con Bacto Agar sin etil ferulato como control negativo. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

-Índice de potencia

Para calcular el índice de potencia se efectuaron mediciones de los diámetros a lo largo y ancho del halo de hidrólisis y de la colonia formada, con estos valores se calculó el área

equivalente del halo (AEH) y el área equivalente de la colonia (AEC). Una vez calculados los promedios de los diámetros para el halo y la colonia con la fórmula 1:

$$(D_1 + D_2) / 2 = D_{\text{prom}} \quad (1)$$

Donde D_1 es diámetro uno, D_2 es diámetro dos, y D_{prom} , diámetro promedio.

Se calcularon las áreas equivalentes para el halo y la colonia con la fórmula 2:

$$AE = (D_{\text{prom}}^2 \times \pi) / 4 \quad (2)$$

Donde AE es el área equivalente sea el caso para el halo (AEH) o la colonia (AEC). Por último, la potencia de hidrólisis, se definió como la relación AEH/AEC (Herrera-García, 2003).

5.5.2 Halos de hidrólisis de actividad pectinasa

Después de realizar las pruebas de halos hidrólisis para AFAE se analizaron solo las que dieron el ensayo positivo. Por medio de la formación de halos de hidrólisis se determinó también actividad pectinasa, la cual está reportado que actúa sinérgicamente con las FAE según lo explicado en el Análisis bibliográfico. El método consistió en preparar un medio de cultivo constituido de agar bacteriológico adicionado con pectina de manzana preparada a una concentración de 2 g/l. En cada caja de Petri se colocó una suspensión de esporas del hongo seleccionado ($5 \mu\text{l}$, 10^7 esporas/ml) y fueron incubadas a 30°C durante 96 horas, utilizando un control negativo del medio sin inocular. Transcurrido este tiempo las cajas fueron inundadas con una solución acuosa de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 1 % y se observó la presencia o ausencia de halos de hidrólisis (Antier *et al.*, 1993). También se utilizó como un control positivo la enzima poligalacturonasa (Sigma Aldrich, E.C. 3.2.1.15) proveniente de un extracto enzimático producido por el hongo *Aspergillus niger* (Yegres *et al.*, 2001).

5.6 Fermentación en medio sólido utilizando pulpa de café

5.6.1 Medios y condiciones de cultivo

Para determinar el medio de cultivo a utilizar y las condiciones de cultivo más apropiadas para la producción de FAE se realizaron 3 cultivos cuyas condiciones se describen a continuación.

1) Fermentación sólida tipo Koji

Para realizar este cultivo se emplearon matraces de 250 ml con PC pre-tratada (20 min a 45 °C), empleando un medio básico mineral adicionado con maltosa (Asther *et. al.* 2002), un inóculo de 2×10^7 esporas/g de materia seca y una humedad del 65 %. Se colocaron 10.2 g de PC en cada matraz (análisis por triplicado) y se utilizó como control PC con medio sin inocular. El tiempo de fermentación fue de 90 horas y se mantuvo a 30 °C.

2) Fermentación en columna

En este tipo de fermentación se realizaron diferentes cultivos:

A. Para esta fermentación se utilizaron columnas de vidrio y PC pretratada (20 min a 45 °C), en tres unidades experimentales se utilizó únicamente pulpa como sustrato y para otras tres columnas se adicionó a la PC un medio básico mineral adicionado con maltosa (Asther *et. al.* 2002). La composición del medio propuesto por Asther (2002) estuvo constituido de la siguiente manera (en g), por cada 100 g de PC se adicionaron: Tartrato diamonio, 12.3; extracto de levadura, 3.4; KH_2PO_4 , 1.3, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.09; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.3; y maltosa; 16. Se utilizó un inóculo de 2×10^6 esporas/g de materia seca, una humedad del 71 % y un flujo de aire de 20 ml/min. El tiempo de fermentación fue de 90 horas a 30 °C.

B. En un segundo experimento se utilizaron también columnas de vidrio. La PC pre-tratada y el medio de cultivo (Asther *et al.*, 2002) fueron los mismos. En este caso se varió la humedad (65 %), la cual ha sido utilizada en estudios previos para la producción de enzimas en PC (Antier *et al.*, 1993). El inóculo se preparó a 2×10^7 esporas/g de materia seca. Se tomaron muestras a las 19 y 36 horas de cultivo incubando 30 °C.

C. En esta fermentación, a la PC pre-tratada (55 °C y 34 min) se le adicionaron 4 proporciones diferentes de medio de cultivo (medio mineral Asther): 25, 50, 75 y 100 %, más una muestra con PC sola; y se empacaron estas 5 condiciones en columnas de vidrio. Se incubaron a 30 °C y para cada medio de cultivo se tomaron muestras a 12 y 36 horas, cada condición se ensayó por duplicado.

5.6.2 Extracto enzimático

Las condiciones para obtener el extracto de la fermentación tipo Koji y de las columnas fue similar. El extracto enzimático se obtuvo de colocar PC, después del proceso de fermentación, en matraces Erlenmeyer adicionando 30 ml una solución de MOPS 50 mM por cada 5 g de materia fermentada húmeda. Con un agitador magnético se realizó la mezcla durante 30 minutos a 4 °C, y posteriormente se centrifugó. El sobrenadante se filtró para su análisis de actividad enzimática ya sea por cromatografía en capa fina o por HPLC.

5.6.3 Condiciones de cultivo seleccionadas

Se realizó una cinética de fermentación utilizando el medio seleccionado a partir de los ensayos ya mencionados anteriormente. Se tomaron muestras a las 0, 10, 15, 20, 25 y 36 horas. El proceso para obtener el extracto enzimático fue el mismo y el análisis de actividad enzimática fue realizado por HPLC.

5.7 Técnicas analíticas

5.7.1 Observaciones al microscopio

Se realizaron preparaciones para ser observadas al microscopio, para esto se tomó una muestra de la superficie de una caja de Petri cultivada con el hongo. Se utilizó cinta adhesiva de alta transparencia para tomar esporas y micelio, tomado de entre el centro y la periferia de la colonia. Las preparaciones fueron teñidas con lactofenol y azul de algodón. La finalidad de estas observaciones fue determinar el género del microorganismo.

5.7.2 pH

La medición se realizó con un potenciómetro marca *Conductronic pH 120* y el pH se midió directamente con el electrodo del equipo. El potenciómetro se calibró previamente con soluciones amortiguadoras (Sigma-Aldrich) de pH 4.0 y 7.0.

5.7.3 Humedad

El contenido de humedad de las muestras fue determinado con una termobalanza OHAUS MB45, los resultados se expresaron como porcentaje en base húmeda. Se realizaron al menos dos repeticiones para cada muestra.

5.7.4 Medición indirecta del crecimiento por CO₂

Se utilizó la producción de CO₂ como indicador indirecto del crecimiento del hongo seleccionado. Se utilizó un cromatógrafo Gow-Mac 580, equipado con una columna concéntrica Alltech (CRTI) y detector de conductividad térmica para cuantificar la concentración de CO₂ (%) en el aire de salida de las columnas. Los parámetros de operación del cromatógrafo fueron:

Temperatura de la columna: 45 °C

Detector: 150 mA

Fase móvil: Helio

Flujo de aire por columna: 20 ml/min

Los resultados fueron procesados por el paquete CHROMA para la concentración de CO₂. La cantidad total de CO₂ producido durante la fermentación se obtuvo del cálculo del área bajo la curva obtenida en la grafica de la velocidad de producción contra el tiempo (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). Los resultados se expresaron en mg CO₂/ h gMSI y mg CO₂/gMSI. La velocidad específica de producción de CO₂ expresada en mg/h gMSI se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$r_{\text{CO}_2} = \frac{(\% \text{CO}_2)(F)(PM)(fc)}{(MSI)100}$$

Donde:

r_{CO_2} : Velocidad específica de producción de CO₂ (mg/h g MSI)

%CO₂: % v/v determinado por análisis de los gases de salida

F: Flujo de aire al reactor (ml/h)

PM: Peso molecular del CO₂ (44 mg/mmol)

Fc: Factor de corrección (0.031 mmol/ml)

MSI: Contenido de materia seca del medio sólido al inicio de la fermentación (g)

Para estimar la acumulación total de CO₂ producido, en las diferentes condiciones estudiadas, se calcularon las integrales de las curvas de velocidad de producción de CO₂ utilizando la regla de los trapecios según las ecuaciones siguientes:

$$C_{CO_2} = r_i * \Delta t + ((r_{i+1} - r_i) * \Delta t / 2)$$

$$CO_{2TOTAL} = \Sigma C_{CO_2}$$

Por otra parte, el tiempo de germinación (t_{lag}) se calculó usando la gráfica de producción acumulada de CO₂ contra el tiempo; la intersección con el eje X de la recta obtenida entre la fase de crecimiento exponencial y la fase de desaceleración se tomó como tiempo de germinación. La velocidad específica de crecimiento μ_{CO_2} se determinó como la pendiente de la línea recta obtenida en la gráfica del logaritmo natural del CO₂ ($\ln CO_2$) producido contra el tiempo.

5.7.5 Conteo de esporas

Después de 5 días de incubación de *Aspergillus* sp. V13207 en el medio de esporulación (PDA), se adicionaron 10 ml de Tween al 0.01 % esterilizado previamente, a continuación se desprendieron las esporas con un agitador magnético, esto se llevó a cabo en la campana de flujo laminar. Se obtuvo una suspensión de esporas que se diluyó hasta obtener la concentración requerida. El número de esporas por ml de suspensión inicial se determinó por conteo en la cámara de Neubauer de 16 por cuadrícula, se contaron 9 cuadrículas de las 25 de la cámara. La fórmula empleada (3) se describe a continuación:

$$N = n * F * 1/D \quad (3)$$

Donde:

N: Número de esporas/ml de suspensión inicial

n: Promedio del número de esporas contadas en la cámara de Neubauer

F: Factor de la cámara empleada (25×10^4)

D: Dilución empleada para el conteo.

5.7.6 Método de fenol-sulfúrico

Para determinar los azúcares totales se utilizó el método colorimétrico del fenol-sulfúrico o método de Dubois (Dubois *et al.*, 1956). Esta técnica es utilizada para una determinación cuantitativa y colorimétrica de los azúcares y sus metil derivados, oligosacáridos y polisacáridos. La reacción es estable, sensible y produce un color amarillo-naranja.

El procedimiento fue el siguiente: Se adicionó 1 ml de la solución de carbohidratos en los tubos, luego se agregó 1 ml de fenol al 5 % y con cuidado se adicionaron después 5 ml de H₂SO₄ concentrado con agitación continua. Se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos y se agitó nuevamente. Los tubos se colocaron en baño maría (25-30 °C) de 10 a 20 minutos y se leyeron las absorbancias a 490 nm, la reacción produjo el color característico amarillo-naranja para hexosas. La concentración de azúcares se determinó con ayuda de una curva patrón de 0 a 0.1 mg/ml. Los blancos se prepararon utilizando agua destilada en lugar de la solución de azúcar.

5.7.7 Cuantificación de ácidos hidroxicinámicos y derivados por HPLC

Esta técnica analítica se empleó para cuantificar los AH presentes en los extractos obtenidos con los disolventes y de los extractos enzimáticos producidos en las fermentaciones.

A. Análisis de extractos con mezclas metanol:agua. Se utilizó un equipo HPLC marca *Thermoseparation* equipado con detector de arreglo de diodos con una columna Polaris 5 Amide C-18. Las condiciones de operación fueron: Fase móvil en condiciones isocráticas, agua-ácido acético-metanol (80:5:15, v/v); flujo de 1.2 ml/min y temperatura ambiente de 25 °C aprox. (Hegde *et al.*, 2006). Se realizó una curva estándar para cada AH estudiado (AF, caféico y *p*-cumárico) obteniendo los tiempos de retención correspondientes.

B. Análisis de extractos obtenidos para estudiar el efecto del tiempo y temperatura. Se realizó el análisis de AH con la fase móvil propuesta por Hegde y colaboradores (2006), utilizando un equipo HPLC (*Agilent 2000*) con arreglo de diodos bajo las siguientes condiciones de operación: Fase móvil en proceso isocrático, agua-metanol-ácido acético (80:19.9:0.1), columna Platinum EPS C-18 100, 3 µm, tipo Rooket (53 mm x 7 mm, Altech); y

flujo de 1 ml/min. Se diluyeron 50 mg del liofilizado por cada ml de disolvente seleccionado, realizando a cada muestra el análisis por HPLC por triplicado.

C. Cuantificación en extractos enzimáticos

Para el análisis se utilizó un equipo HPLC marca *Thermoseparation* con arreglo de diodos con una columna C-18, utilizando una longitud de onda de 320 nm. La fase móvil utilizada fue de metanol-agua (60:40), con un flujo de 1 ml/min. Se determinó metil ferulato, etil ferulato y AF resultado de la acción de la actividad enzimática.

5.7.8 Actividad feruloil esterasa

La AFAE se determinó de dos maneras: Cromatografía en capa fina y HPLC.

1) Cromatografía en capa fina

Las cromatografías en capa fina se realizaron utilizando placas de cromatografía de sílica gel (Merck 60 F₂₅₄, 0.2 mm; Darmstadt, Alemania). Se utilizaron dos sistemas de disolventes dependiendo su utilidad la cual se explica a continuación. Esta metodología permitió observar si la cepa estudiada o los extractos producidos producen la enzima que hidroliza el enlace éster del etil ferulato para obtener AF.

A. Halos de hidrólisis. En los halos de hidrólisis se utilizaron las siguientes condiciones: Los estándares de etil ferulato, AF y los extractos con metanol de la zona del halo de hidrólisis de la AFAE (zona verde-amarilla) y la zona no hidrolizada (zona azul), todos se eluyeron con una mezcla de metanol:cloroformo, 1:49, v/v, (Donaghy y McKay, 1994).

B. Extractos enzimáticos. El segundo método de cromatografía de capa fina permitió determinar cual extracto enzimático presentó la actividad enzimática que hidroliza el enlace éster del etil ferulato para obtener AF. Se utilizaron como estándares etil ferulato y AF; y como eluyente se empleó una fase móvil de acetato de etilo-benceno-2-propanol (2:1:0.1) reportado por Mastihuba *et al.*, 2002.

2) Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Las determinaciones cuantitativas de la AFAE fueron realizadas por HPLC. A los extractos enzimáticos se les determinó la actividad enzimática utilizando etil ferulato como sustrato, incubando a 37 ° C, en una solución de MOPS 100 mM y pH 6.5. El tiempo de reacción fue de 1 hora, posteriormente se realizó una cinética de reacción tomando muestras a los 0, 3, 6, 9, 15, 30 y 60 min.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 6

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados obtenidos del estudio de producción de enzimas tipo FAE utilizando la FMS como sistema de cultivo y PC como sustrato. La primera parte, corresponde a los resultados de la extracción de AH no esterificados de la pared celular de la PC, posteriormente se presenta la selección de la cepa que produce la enzima, y por último la producción de la enzima en FMS.

6.1 Selección del disolvente para la extracción de AH no esterificados

Los disolventes a utilizar para la extracción de los AH no esterificados fueron seleccionados de acuerdo a la cantidad de compuestos extraídos. Las mezclas de disolventes analizados fueron metanol 100%, metanol-agua (80:20) y metanol-agua (60:40). La PC libre de otros materiales, molida y tamizada fue tratada con estos tres disolventes a una temperatura de 45 °C durante 20 min, a las muestras se les realizaron tres extracciones sucesivas con cada disolvente (Figura 6.1).



Figura 6.1 Extracción de la pulpa de café a 45 °C por 20 minutos.

La extracción sucesiva ocasionó una pérdida de peso de la PC, la cual se puede observar en la Figura 6.2, donde se muestran los resultados después de realizar las 3 extracciones con el disolvente.

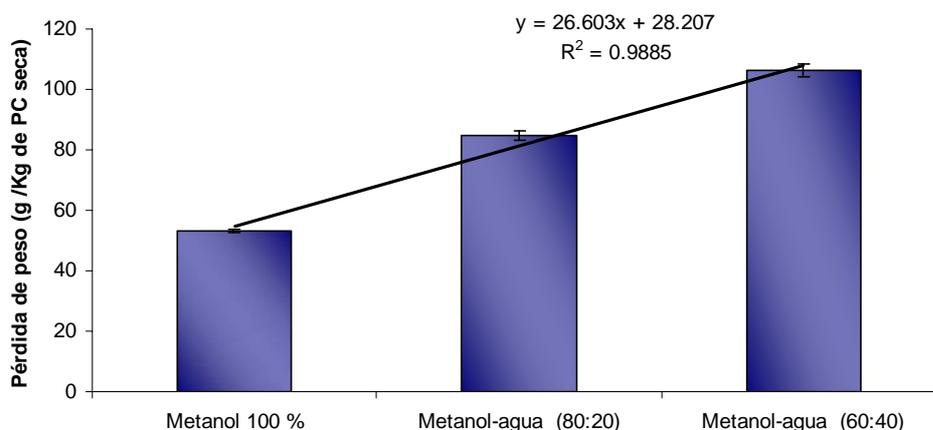


Figura 6.2 Pérdida de peso en la pulpa de café

Se observa que a medida que aumenta la proporción de agua y la polaridad de la mezcla del disolvente se incrementa el porcentaje de compuestos solubles de la PC, en este caso la mezcla con mayor extracción es la de metanol-agua (60:40). Por otra parte, en los liofilizados obtenidos de la mezcla metanol-agua (60:40) se encontró una mayor proporción de azúcares totales extraídos (Figura 6.3), lo que indica que esta mezcla también extrae importantes cantidades de nutrientes como son los azúcares, mientras que la que tuvo menor cantidad de azúcares totales extraídos fue la de metanol 100%. Tanto en los resultados de pérdida de peso en la pulpa de café como en las pruebas de azúcares totales se observó un comportamiento lineal ($R^2 = 0.9885$ y $R^2 = 0.9852$, respectivamente), este comportamiento se debe al aumento de la polaridad del solvente utilizado durante la extracción.

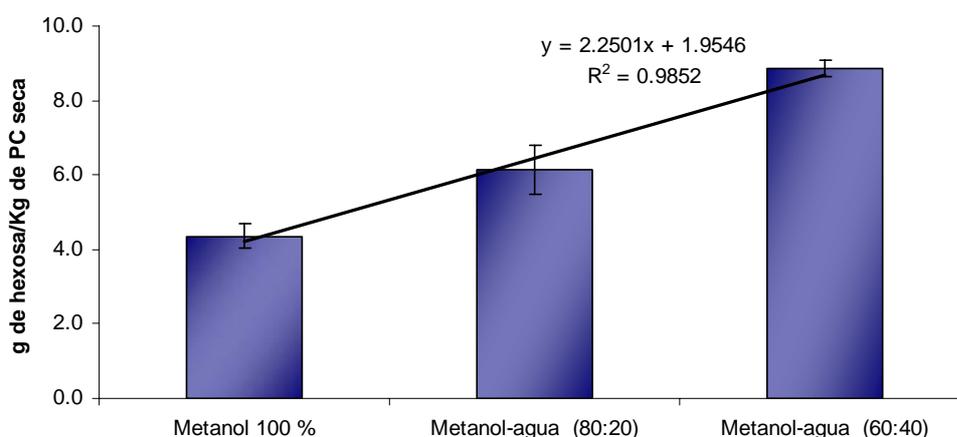


Figura 6.3 Análisis de azúcares a liofilizados.

Al realizar el análisis por HPLC de los estándares de ácidos fenólicos con la fase móvil (Hegde *et al.*, 2006): agua-ácido acético-metanol (80:5:15, v/v), se obtuvieron los siguientes tiempos de retención (min): Ácido caféico, 14.73; AF, 28.01; y ácido *p*-cumárico, 29.75.

Por otra parte, al analizar los tres disolventes de extracción se encontró que con la mezcla metanol-agua (80:20) se extrae la mayor cantidad de ácido caféico y *p*-cumárico, y la menor cantidad de AF (Figura 6.4), en comparación con el metanol 100% y metanol-agua (60:40).

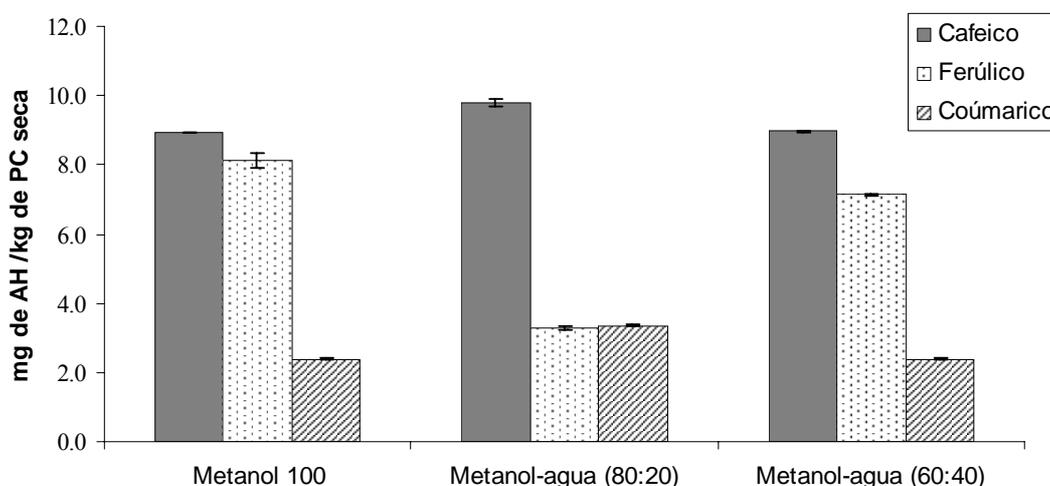


Figura 6.4 Extracción de los ácidos hidroxicinámicos con diferentes proporciones de disolventes.

La extracción selectiva de los AH no esterificados: caféico y *p*-cumárico, permitirá utilizar la pulpa como sustrato para producción de la enzima por FMS, ya se ha demostrado que estos dos ácidos fenólicos producen inhibición a la actividad enzimática de la FAE (Faulds *et al.*, 1999b). En trabajos previos relacionados con la extracción de ácidos fenólicos en la PC, se demostró que el metanol proporciona los mejores resultados y el agua en segundo lugar. Basándose en estos resultados se determinó la primera etapa de la extracción selectiva iniciando con mezclas de metanol-agua, en una segunda parte se establece la optimización de las condiciones de extracción usando MSR. Finalmente, la preparación de un sustrato para la producción de enzimas FAE requiere obligatoriamente de un proceso de extracción selectiva de AH libres (en particular el ácido caféico y *p*-cumárico), como el que aquí se propone, evitando de esta manera disminuir la producción de la enzima FAE en estudios posteriores.

6.2 Optimización de la extracción de ácidos hidroxicinámicos mediante MSR

Después de determinar que el solvente a utilizar para las extracciones es la mezcla de metanol-agua (80:20), lo siguiente fue estudiar el efecto de los factores tiempo y temperatura durante la extracción de estos AH libres. Las extracciones se realizaron de acuerdo al diseño experimental propuesto (diseño factorial compuesto con punto central). Para las extracciones se utilizó un rotavapor que permitió tener un mayor contacto entre el disolvente y la PC (Figura 6.5).

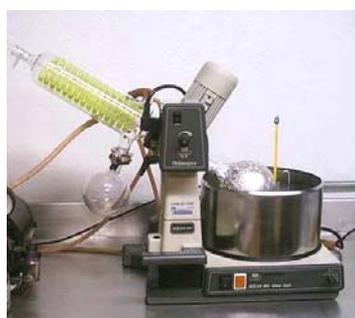


Figura 6.5 Extracción en rotavapor.

El análisis de cada uno de las condiciones del diseño se realizó por triplicado y cada una de estas muestras se analizó por HPLC (fase móvil: agua-metanol-ácido acético, 80:19.9:0.1) y cada una se analizó por duplicado. Para este análisis se obtuvieron los siguientes tiempos de retención (min): Ácido clorogénico, 1.44; ácido caféico, 6.56; AF, 11.04, ácido *p*-cumárico, 15.4. En este estudio se incluyó al ácido clorogénico, el cual es uno de los AH abundantes en la PC. Este método de HPLC permitió reducir los tiempos de análisis, en comparación con el utilizado en la selección del solvente, esto se debió a que las condiciones de trabajo fueron distintas en cuanto a equipo, columna y condiciones de operación y fase móvil.

El contenido de AH, los sólidos solubles extraídos liofilizados y los azúcares totales extraídos bajo las condiciones señaladas en la sección de Materiales y métodos fueron analizados estadísticamente por MSR. Las regresiones de cada superficie fueron revisadas con los correspondientes análisis de varianza (ANOVA), presentando todas significancia de acuerdo a la prueba *F*, además se calculó el coeficiente de determinación R^2 para cada una de ellas (Tabla

6.1). Los resultados de los ANOVA de cada una de las superficies se presenta en el Anexo, así como el análisis por la prueba *t* de Student de los coeficientes obtenidos de las regresiones. La significancia de estos coeficientes se consideró a un $P < 0.05$. Los resultados para cada una de las superficies se presenta en la Tabla 6.1, donde se indican los valores de los coeficientes y su respectivo coeficiente de determinación (R^2).

Tabla 6.1 Valores de los coeficientes y R^2 del análisis por superficie de respuesta para: Pérdida de peso (% sólidos solubles), los ácidos hidroxycinámicos (mg/Kg de PC seca) y azúcares totales (g/Kg de PC seca).

Coefficientes	Pérdida de peso (% BS)	Ácido clorogénico	Ácido caféico	Ácido <i>p</i>-cumárico	Ácido ferúlico	Azúcares totales
R^2	0.8724	0.9099	0.9005	0.9088	0.9607	0.8780
Intercepto	125.83*	-125.66*	13.06*	10.05*	4.61*	-0.26
Tiempo (min)	0.862*	3.548*	0.058	0.015	-0.056*	0.060*
Temperatura (°C)	-0.486	5.308*	-0.502*	-0.417*	-0.190*	0.072*
Tiempo ²	-0.014*	-0.040*	-4.4E-04	-0.001	0.001*	---
Temperatura ²	0.009	-0.042	0.007*	0.005*	0.002*	---
Tiempo x Temperatura	0.001	-0.020	0.001	0.001*	0.001*	---

*Significativos ($P < 0.05$)

En esta Tabla se presentan valores $R^2 > 0.87$, esto nos indica que la variabilidad de los datos está explicada por los modelos de manera adecuada. Y en el caso de las extracciones de ácido ferúlico, caféico y cumárico presentaron un comportamiento cuadrático según se aprecia por la significancia de sus coeficientes, mientras que las regresiones restantes presentaron un comportamiento lineal.

Las curvas de nivel para los AH estudiados se presentan en la Figura 6.6a, b, c y d, esta representación permitió encontrar las condiciones de temperatura y tiempo en donde se logra

extraer la mayor cantidad de AH. Se puede observar que en un tiempo de 35 minutos y una temperatura de 55 °C, la extracción es mayor para cada uno de los compuestos estudiados ácido clorogénico, caféico *p*-cumárico y ácido ferúlico.

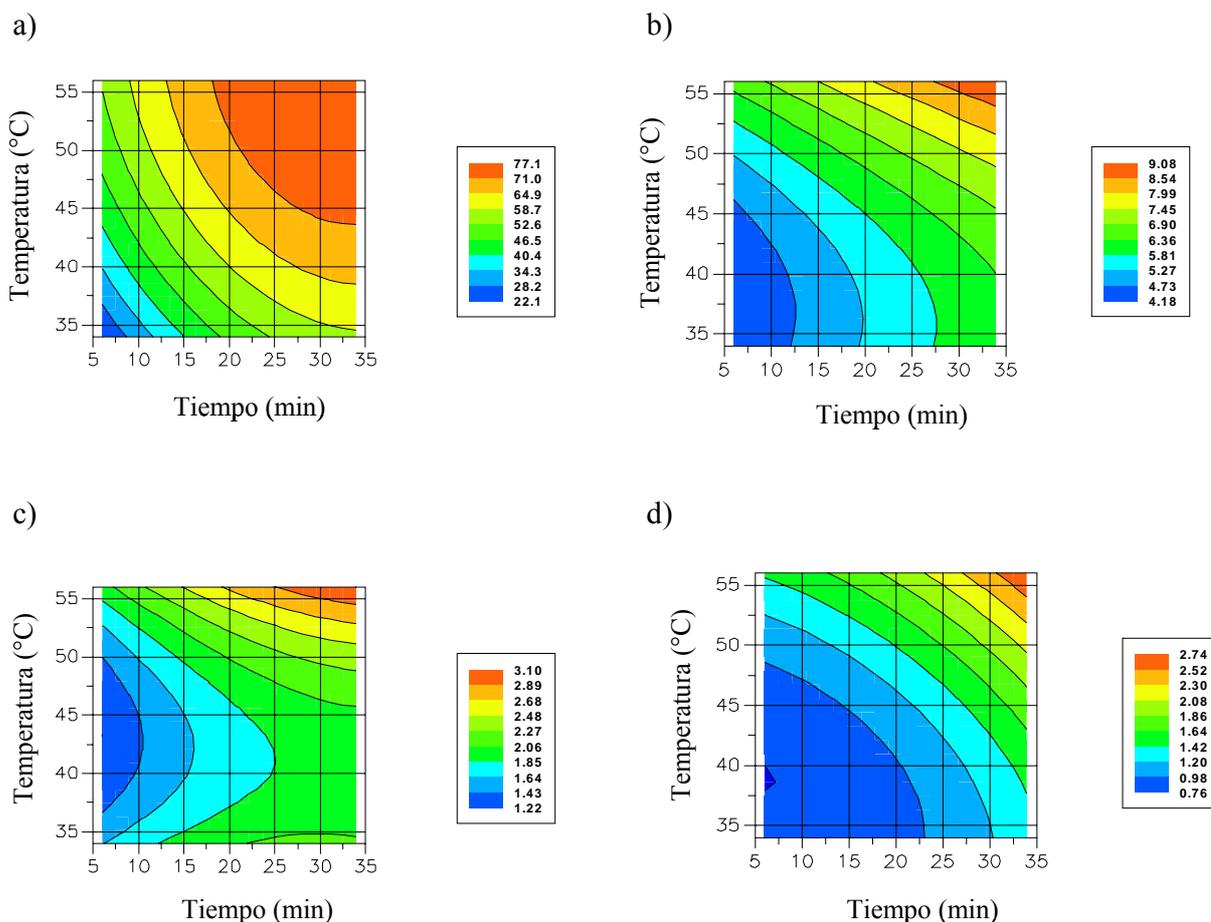


Figura 6.6 Curvas de nivel para los AH analizados: a) ácido clorogénico, b) ácido caféico, c) ácido *p*-cumárico y d) ácido ferúlico, las unidades son mg/ kg de PC seca

El análisis por curvas de nivel correspondiente a los azúcares totales y pérdida de peso se presenta en la Figura 6.7. En este análisis se puede observar que hay un comportamiento similar al de los AH, se logran cuantificar en mayor medida en un tiempo de 35 minutos y una temperatura de 55 °C.

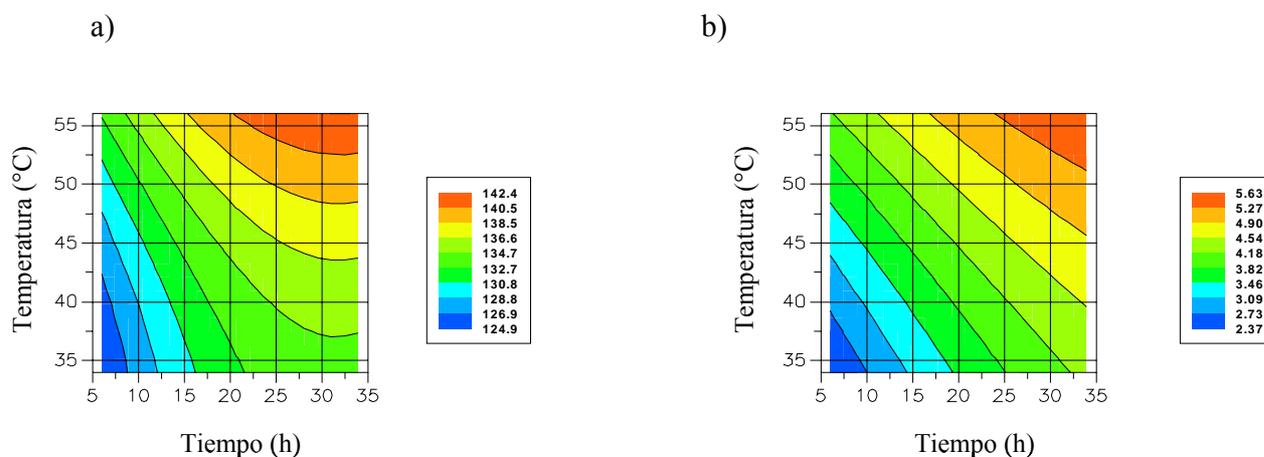


Figura 6.7 Curvas de nivel a) Pérdida de peso en PC (mg/Kg de PC seca) y b) Azúcares totales (g de hexosas/Kg de PC seca)

Estas condiciones de extracción favorecieron la extracción de los AH libres presentes en la PC, lo cual permitió tener al final una pulpa sólo con los AH ligados a su pared celular, esto será de mucha importancia para los estudios posteriores para la producción de la FAE por FMS. Este tipo de estudio de optimización de la extracción de AH libres de la PC mediante MSR no ha sido reportado con anterioridad lo cual puede servir de base para estudios posteriores.

La cantidad de AH reportados en PC es muy variada, Labat (2000) señaló que el ácido ferúlico se encuentra presente en proporciones cercanas a 1000 mg/Kg y el ácido cafeico de 3100 a 16000 mg/kg, mientras que Benoit *et al.* (2006) reportaron 240 mg/Kg para el ácido ferúlico, y 2660 mg/kg para el ácido caféico; sin embargo, estos resultados fueron obtenidos por hidrólisis alcalina. En el presente estudio se lograron extraer de la PC, 76.4 mg de ácido clorogénico, 9.02 mg de ácido caféico, 3.10 mg ácido *p*-cumárico y 2.55 mg ácido ferúlico por Kg de PC seca, utilizando metanol agua (80:20), y tratando de evitar hidrólisis en la pared celular. Estos valores representan una pequeña proporción de los AH presentes en la PC, lo que indica que la mayor parte de estos compuestos pueden estar fuertemente ligados a la pared celular. Kim *et al.* (2006) observaron algo muy similar cuando estudiaron los AH de 2 variedades de salvado de trigo (salvado de trigo rojo y blanco), su trabajo tuvo como objetivo analizar cualitativa y cuantitativamente los ácidos fenólicos, estudiar el efecto de la hidrólisis y la influencia de las

condiciones de extracción en el rendimiento y la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. Por extracción metanólica se obtuvieron los AH libres y posteriormente se realizó una extracción alcalina y ácida a los residuos. Se reportaron 2.46 ± 0.08 mg/Kg de AF libre, mientras que el total de AF fue de 2020 ± 0.94 mg/Kg para el caso de la variedad de salvado de trigo rojo y 4.13 ± 0.00 mg/Kg de un total de 1992 ± 5.81 mg/Kg para la variedad de salvado de trigo blanco, esto significó que una pequeña proporción de AH se encontró libre, algo que también se presentó en este trabajo. Para el caso del ácido caféico y *p*-cúmarico no se lograron extraer AH libres, sin embargo después con hidrólisis alcalina y ácida, se encontraron 1.78 ± 0.00 y 46.6 ± 0.22 mg/Kg para la variedad roja y 38.8 ± 0.03 mg/Kg de *p*-cumárico para la variedad blanca.

6.3 Criterio de selección de la cepa

A partir de 13 cepas de hongos filamentosos se seleccionó una de ellas utilizando un criterio basado en que presentaran AFAE y actividad pectinasa al mismo tiempo, tales actividades se determinaron por la formación de halos de hidrólisis. Los resultados obtenidos en ambas determinaciones se presentan a continuación.

6.3.1 Determinación de la actividad feruloil esterasa por halos de hidrólisis

La primera etapa de selección consistió en realizar el cultivo en agar en presencia de etil ferulato de 12 hongos filamentosos de la colección UAM-IRD y 1 del CINVESTAV. Se observó la capacidad de las cepas de crecer en un medio constituido únicamente por Bacto Agar adicionado con etil ferulato, después de 5 días en cajas de Petri solo continuo creciendo la cepa de *Aspergillus tamarii* V12307, lo que indicó que este microorganismo tuvo la capacidad de utilizar etil ferulato como fuente de carbono. Al adicionar la solución indicadora de verde de bromocresol se observó además un halo de hidrólisis (Figura 6.8 a y b) que indicó la presencia de una AFAE y la liberación de AF.

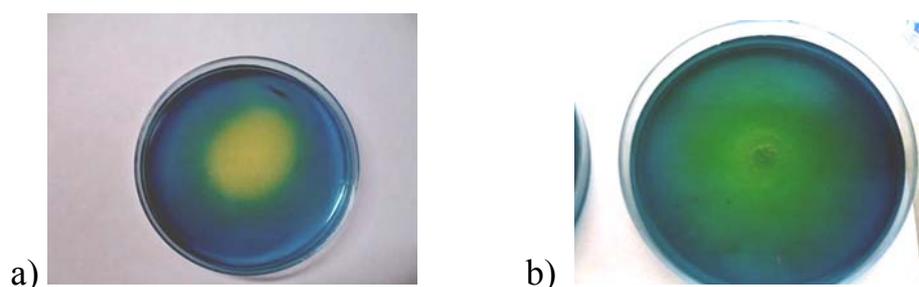


Figura 6.8 Halos de hidrólisis de la actividad feruloil esterasa para: (a) una pectinasa comercial de *Aspergillus niger* (Sigma) y (b) *Aspergillus tamarii* V12307.

Por otra parte, por análisis de cromatografía en capa fina se observó la hidrólisis del etil ferulato a AF, las muestras obtenidas del halo de hidrólisis y de la zona no hidrolizada. Los valores R_f observados para etil ferulato y AF fueron 0.69 y 0.09, respectivamente. El análisis por halos de hidrólisis y por cromatografía en capa fina resultaron útiles para determinar la presencia de esta actividad enzimática. *Aspergillus tamarii* V12307 presentó un halo de hidrólisis, lo que permitió calcular un índice de potencia de 6.41 ± 0.91 . En este estudio, de los 13 microorganismos probados sólo la cepa *Aspergillus tamarii* V12307 logró producir halo de hidrólisis por este motivo no fue necesario realizar la comparación del tamaño de los halos entre las demás cepas.

Donaghy y McKay (1994), utilizaron esta metodología para hacer la selección en una gran variedad de levaduras (*Rhodotorula* spp. y *Candida* spp.) y hongos filamentosos (*Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.) dando resultados positivos. Los resultados se confirmaron con enzimas comerciales donde se pudo observar la formación de halos de hidrólisis. En algunas bacterias (*Bacillus* sp. y *Lactobacillus*) también se ha utilizado esta metodología (Donaghy *et al.*, 1998). Este método permite realizar la selección en una gran cantidad de cepas y es sencillo sin la necesidad de utilizar técnicas más complejas como el HPLC o GC (Gas Chromatography).

6.3.2 Determinación de la actividad pectinasa por halos de hidrólisis

La cepa *Aspergillus tamarii* V12307, seleccionada por su actividad FAE, presentó crecimiento al utilizar el medio Bacto Agar adicionado con pectina produciendo un halo de

hidrólisis típico de esta actividad enzimática. Para este análisis se utilizó un control positivo que consistió de colocar una enzima comercial (pectinasa de *A. niger*). El halo de hidrólisis que se logró formar en el caso de la enzima comercial y la cepa seleccionada (Figura 6.9).

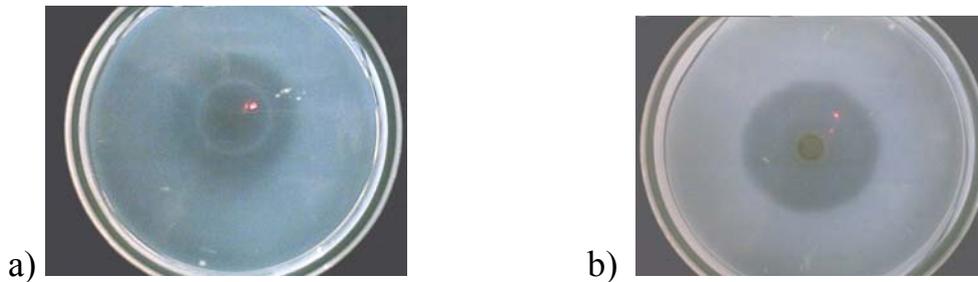


Figura 6.9 Halos de hidrólisis de actividad pectinasa de: (a) Enzima comercial pectinasa de *Aspergillus niger* y (b) *Aspergillus tamaritii* V12307.

De igual manera, fue posible calcular el índice de potencia de hidrólisis del halo formado producto de la actividad pectinasa: 37.49 ± 4.0 . A partir de la selección de *Aspergillus tamaritii* V12307, a través del método de los halos de hidrólisis, se le realizó la prueba para actividad pectinasa (Antier *et al.*, 1993; Yegres *et al.*, 2001), siendo de fundamental importancia que el microorganismo seleccionado presentara también esta actividad enzimática ya que actúa sinérgicamente con la FAE para la degradación de la pared celular de las dicotiledóneas, como es el caso de la PC (De Vries y Visser, 2001).

Esta metodología se ha utilizado para la selección de cepas mutantes de *A. niger* hiperproductoras de pectinasa para su cultivo en FMS en pulpa de café (Antier *et al.*, 1993) y más recientemente para seleccionar microorganismos capaces de crecer en el medio para producir enzimas pécticas extracelulares con el fin de utilizarlas para fermentación sólida en cáscaras de cacao (Yegres *et al.*, 2001). Este ensayo es de utilidad ya que siendo un método sencillo, rápido y confiable permite distinguir aquellas cepas que pueden producir enzimas que degradan los polisacáridos de la pared celular, las cuales a su vez pueden actuar sinérgicamente con las FAE (De Vries y Visser, 2001). La PC presenta AH con enlaces a estructuras de pectina, por lo tanto, para que la PC funcione como fuente de carbono para el crecimiento de la cepa de hongo filamentoso la presencia de pectinasas es fundamental para que este pueda utilizar azúcares de la pared celular de la pulpa. La cepa *Aspergillus tamaritii* V12307, al presentar estas dos actividades

enzimáticas, AFAE y pectinasa, tiene un potencial importante para liberar AF a partir de dicotiledóneas como la PC. El análisis morfológico por preparaciones al microscopio nos permite elucidar que la cepa se trata de un hongo del género *Aspergillus* (Figura 6.10), para confirmar estas observaciones y conocer la especie se aplicaron herramientas de biología molecular, el análisis mostró que pertenece a la especie *tamaritii* con un porcentaje de similitud. (98%), y la secuencia se presenta en el Anexo 2.

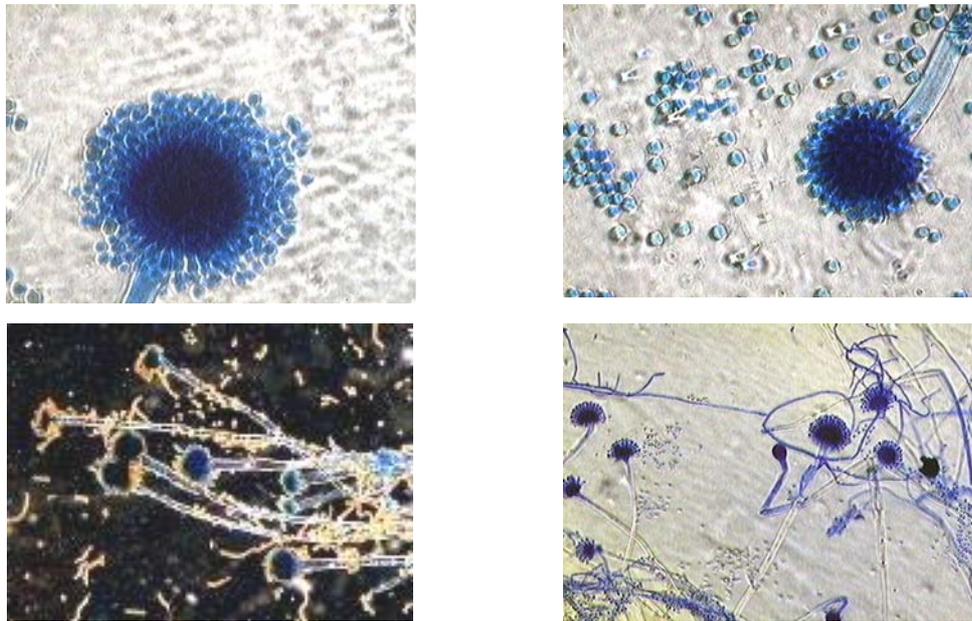


Figura 6.10 Preparaciones de *Aspergillus tamaritii* V12307 observadas al microscopio (10X y 40X).

6.4 Fermentación en medio sólido

En esta etapa del trabajo se presentan los resultados obtenidos de la FMS del hongo filamentoso *Aspergillus tamaritii* V12307. Se estudió la producción de la AFAE utilizando un éster de AF como sustrato de la reacción. Los resultados se han agrupado de la siguiente manera: En la primera sección se presentan las fermentaciones utilizando cultivos tipo Koji en condiciones de fermentación reportadas en estudios previos; en la segunda sección, se reportan los resultados correspondientes a las fermentaciones sólidas con aireación forzada, lo que permitió estudiar el efecto de la adición de un medio de cultivo reportado por Asther *et al.*

(2002) a la PC sobre el crecimiento y actividad enzimática de interés. En la tercera sección se presentan los resultados de las fermentaciones en columna utilizando este mismo medio adicionado en diferentes proporciones. Por último, en la cuarta sección se presentan los resultados de la cinética de las principales variables de la FMS en las condiciones seleccionadas.

6.4.1 Fermentación sólida tipo Koji

Después de 90 horas de fermentación de los cultivos tipo Koji (utilizando matraces), se obtuvieron los extractos enzimáticos producidos así como el extracto correspondiente al control sin inocular. Inicialmente estos extractos se analizaron por cromatografía en capa fina para determinar la presencia de AFAE. Las reacciones enzimáticas se prepararon con etil ferulato como sustrato incubando durante 5 horas a 37 °C. Los resultados por capa fina se presentan en la Figura 6.11, en donde se observan las manchas correspondientes a etil ferulato (sustrato) y ácido ferúlico (producto), ubicadas en la parte superior e inferior, respectivamente. Se puede observar que en el control positivo de pectinasa se logró liberar AF lo que indica que hay hidrólisis del etil ferulato por esta enzima; mientras que en el control sin inocular no se presentó la formación de AF. En cuanto a los cultivos en matraz se observa que si se presentó hidrólisis del etil ferulato apareciendo la mancha correspondiente al AF. Se puede concluir que los extractos si presentaron la actividad enzimática deseada. Y aún cuando esta metodología no es cuantitativa permitió identificar de manera rápida la presencia de la AFAE.

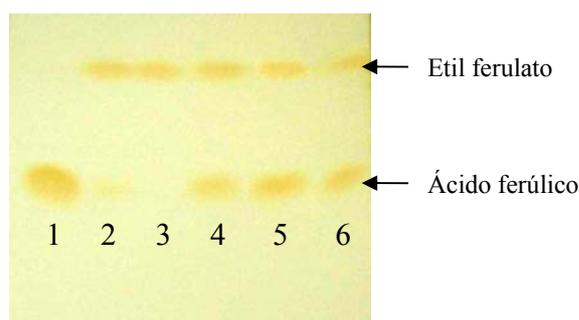


Figura 6.11 Cromatografía en capa fina para determinar la actividad feruloil esterasa de los extractos obtenidos de la fermentación tipo Koji. Líneas: 1) Ácido ferúlico, 2) Control con pectinasa comercial, 3) Control sin inóculo, 4-6) Extracto enzimático por triplicado.

6.4.2 Fermentación en medio sólido con aireación por convección forzada

En esta etapa se prepararon columnas de vidrio empacadas (Figura 6.12) unas solo con pulpa (SP) y otras más con pulpa adicionada con el medio de cultivo (CM) reportado por Asther (2002) y se inocularon con *Aspergillus tamaritii* V12307. La FMS del hongo fue monitoreada en línea a través de la producción de CO₂, como medida indirecta del crecimiento, y finalmente se evaluó la actividad FAE producida, por cromatografía en capa fina.

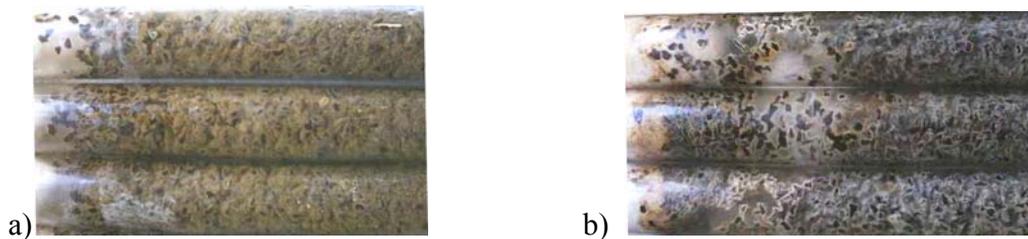


Figura 6.12 Fermentación en columnas: a) Pulpa de café y b) Pulpa de café adicionada con medio reportado por Asther *et al.* (2002).

En la Figura 6.13 se observa la producción de CO₂ acumulado a través del tiempo de fermentación, en ésta se encontraron diferencias en el crecimiento cuando hay medio en la PC y cuando no se le adiciona. Cuando hubo presencia de medio se favoreció el crecimiento, esto puede explicarse por la mayor presencia de nutrientes. Al final de los cultivos se encontraron valores de producción total de CO₂ de 326 y 356 mg/g MSI en condiciones sin medio y con medio, respectivamente.

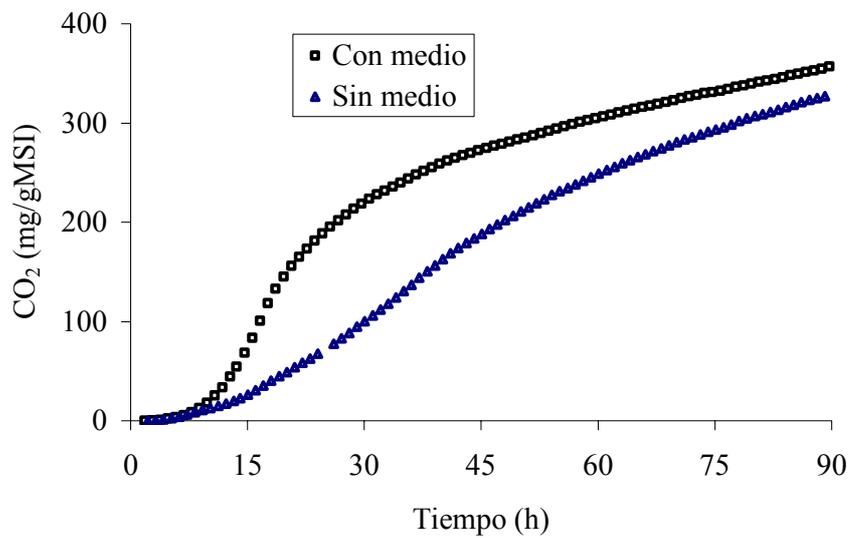


Figura 6.13 Producción acumulada del CO₂ en fermentación en columna de *Aspergillus tamaritii* V12307 utilizando únicamente pulpa de café y pulpa de café adicionada con medio mineral adicionado con maltosa.

Por otra parte, se calculó el logaritmo natural de la producción de CO₂ ($\ln\text{CO}_2$) para ambas condiciones de cultivo (Figura 6.13), encontrando que la fase exponencial se encuentra entre las 10 y 20 h de cultivo cuando hay medio de cultivo, mientras que en ausencia de medio la fase exponencial se presentó más tarde entre las 20 y 40 h. Los cultivos alcanzaron su estado estacionario después de haber terminado la fase exponencial de cada cultivo.

En la zona de crecimiento exponencial es posible calcular la tasa específica respiratoria (μ_{CO_2}) como ya se reportó (Saucedo *et al.*, 1994)

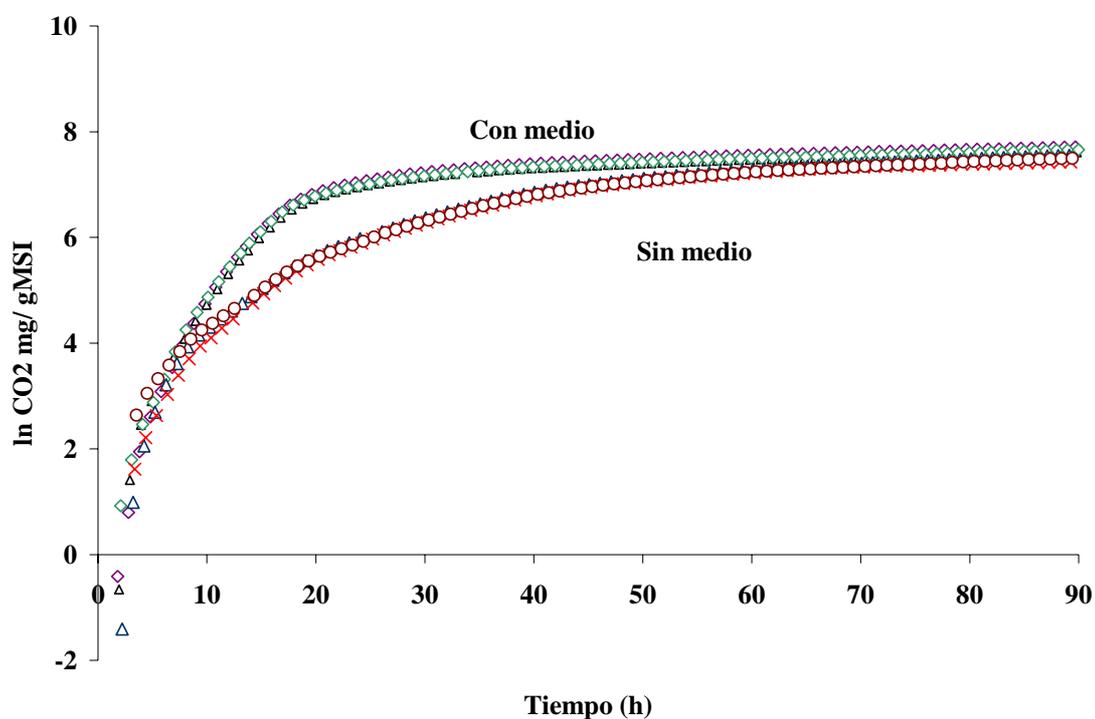


Figura 6.14 Comportamiento del $\ln\text{CO}_2$ con respecto al tiempo en las columnas adicionadas con medio y sin medio.

En la Tabla 6.2 se presentan los valores de la tasa específica respiratoria (μ_{CO_2}) y de los tiempos de germinación (t_{lag}) para las dos condiciones estudiadas. Se puede observar que la adición de medio incrementó la velocidad del crecimiento, mientras que la duración de la fase lag fue poco afectada por la adición del medio. La producción total de CO_2 varió menos del 10 %.

Tabla 6.2 Valores de t_{lag} y μ_{CO_2} de la fermentación en pulpa de café con *Aspergillus tamarii* V12307 con y sin medio propuesto por Asther et al., (2002).

Condición	$\mu_{\text{CO}_2}^*$ (h^{-1})	t_{lag}^* (h)	Producción Total de CO_2 (mg/ g MSI)
Pulpa de café	0.18 ± 0.02	8.0 ± 3.1	326
Pulpa de café + medio	0.38 ± 0.04	7.0 ± 3.4	356

* $P < 0.0001$ en Anova unifactorial

Por otra parte, la AFAE fue determinada para cada condición y se analizó por cromatografía en capa fina. Se tomaron muestras a las 19 y 36 horas de incubación, encontrando que todos los extractos presentaron hidrólisis del éster confirmando la presencia de actividad enzimática. En esta etapa aunque se utilizó un método cualitativo para determinar la AFAE, este permitió demostrar de manera rápida y sencilla que *Aspergillus tamaritii* V12307 puede producir, bajo las condiciones en estudio, un extracto con actividad enzimática.

Finalmente, este estudio permitió concluir que con la adición del medio de cultivo se obtuvieron cultivos con mayor velocidad de crecimiento, aunque en este caso el tiempo de germinación se redujo 1 h. La adición de nutrientes permitió al hongo tener un mejor crecimiento según los resultados de producción de CO₂ y la actividad enzimática se produjo en ambas condiciones. De esta manera, se propuso estudiar de manera más detallada la adición de nutrientes a la PC.

6.4.3 Fermentación con diferentes proporciones del medio de cultivo

Esta fermentación permitió determinar el efecto del medio mineral (estudiado en la sección anterior) sobre la velocidad de producción de CO₂ como medida indirecta de crecimiento y la FAE. La producción de CO₂ a través del tiempo de fermentación para cada condición se presenta en la Figura 6.15.

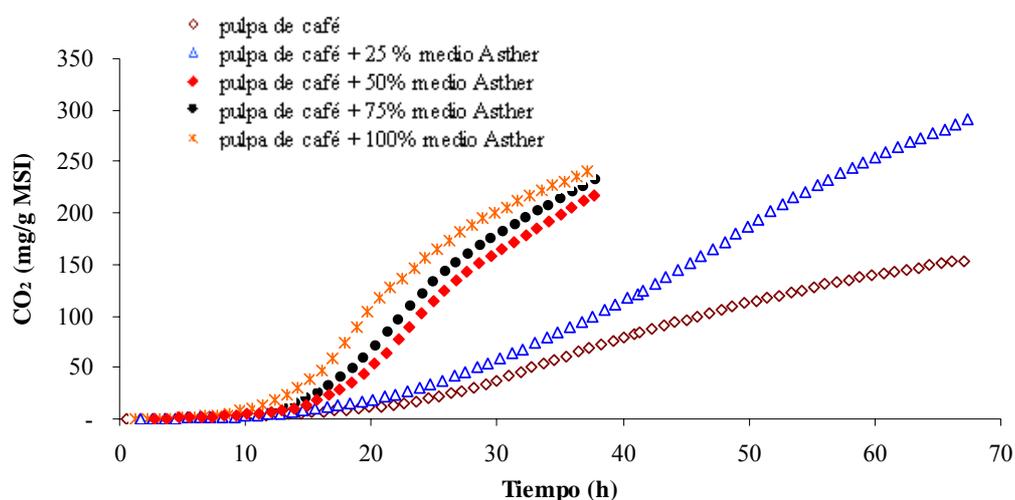


Figura 6.15 Producción de CO₂ en la fermentación de pulpa de café adicionada con diferentes proporciones de medio.

Se calculó el logaritmo de la producción del CO₂ (ln CO₂) a través del tiempo para calcular las tasas específicas de crecimiento para cada una de las condiciones. En la Figura 6.16 se observa que los cultivos tienen una mayor velocidad a medida que se incrementa la concentración de medio de cultivo, los cultivos que tienen solo pulpa, pulpa + medio Asther 25% y 50% llegan a fase estacionaria aproximadamente a las 20 h, mientras que los cultivos con 75 y 100% de medio la alcanzan hasta después de las 40 h de cultivo, estas consideraciones son de importancia al evaluar la productividad de los cultivos.

En la Figura 6.16 se muestran los resultados de los cálculos de los logaritmos naturales de la producción de CO₂ para las diferentes proporciones de medio.

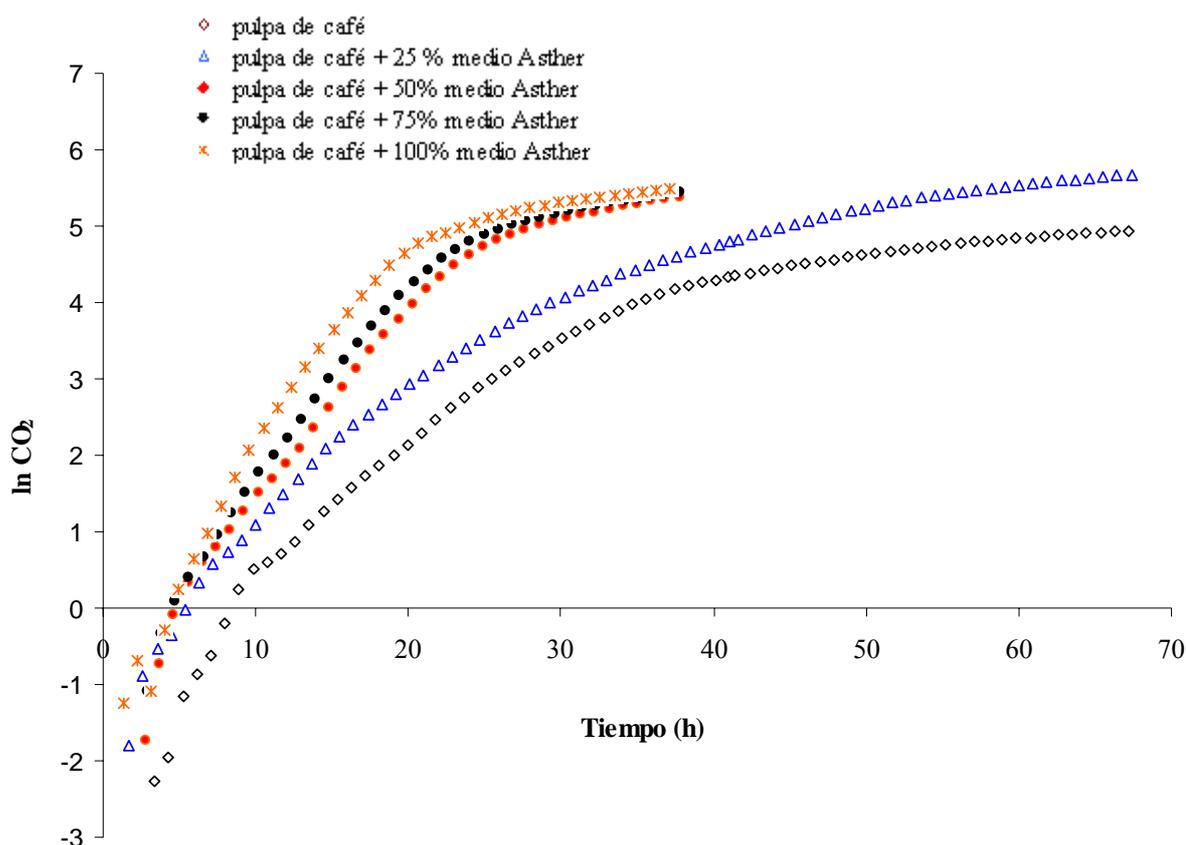


Figura 6.16 Comportamiento del lnCO₂ con respecto al tiempo, en la fermentación de pulpa de café adicionada con diferentes proporciones de medio.

En la Tabla 6.3 se presentan las velocidades específicas de crecimiento y los tiempos de germinación de cada una de las condiciones estudiadas, se confirma que a mayor adición de nutrientes se incrementa la velocidad de crecimiento y los tiempos de germinación disminuyen.

Tabla 6.3. Efecto de la adición de diferentes proporciones de medio de cultivo (Asther *et al.*, 2002) a la pulpa de café.

Condición de cultivo	$\mu_{CO_2}^*$ (h⁻¹)	t_{lag}^* (h)
Pulpa de café	0.14±0.013	18.9±5.1
Pulpa de café + 25% medio	0.16±0.019	17.7±4.3
Pulpa de café + 50% medio	0.25±0.009	15.2±5.7
Pulpa de café + 75% medio	0.26±0.014	13.3±6.9
Pulpa de café + 100% medio	0.29±0.038	11.6±7.6

*P< 0.0001 en Anova unifactorial

En cuanto a la AFAE, esta se determinó utilizando etil ferulato como sustrato e incubando a 37 °C y pH 6.5. Se tomaron muestras a 12 y 37 horas de fermentación de los primeros tres medios de cultivo (100, 75 y 50 %), y 12 y 66 horas para los dos últimos (25 y 0 %). En estas fermentaciones se analizó la actividad enzimática por HPLC, que es un método mucho más preciso y cuantitativo. En este caso se determinó la hidrólisis del enlace éster del metil y etil ferulato para obtener AF.

Los análisis de actividad enzimática realizados a 12 horas presentaron un incremento conforme se aumentó la proporción de medio adicionado, esto se observó en el metil ferulato como sustrato en el ensayo enzimático, mientras que en el caso del etil ferulato la producción fue inferior (Figura 6.17).

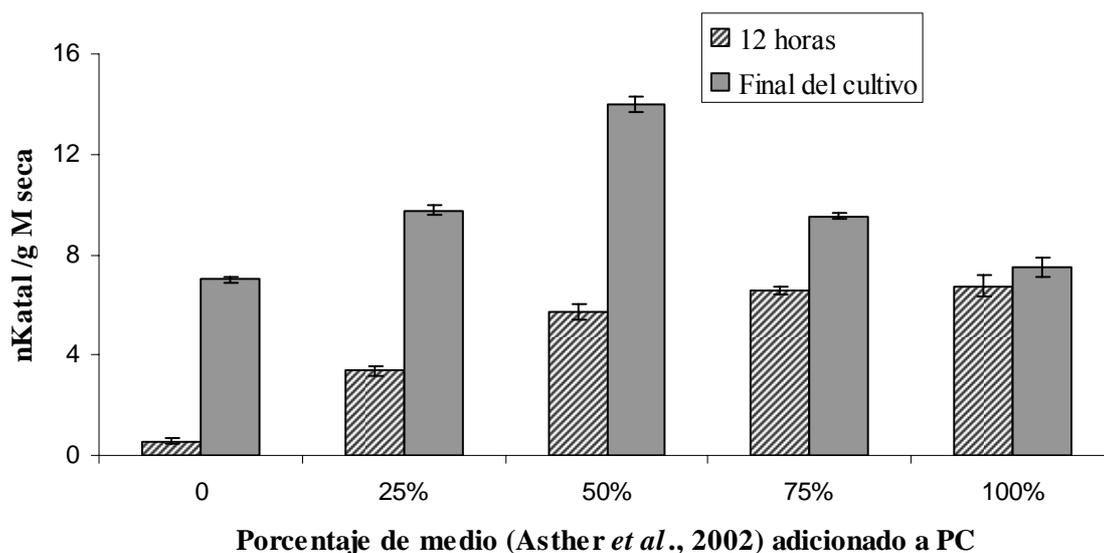


Figura 6.17 Actividad enzimática FAE utilizando como sustrato metil ferulato.

Cabe destacar que la actividad enzimática fue mayor cuando a la PC se le adicionó medio propuesto (50%) en un tiempo de fermentación de 36 horas (Figura 6.18).

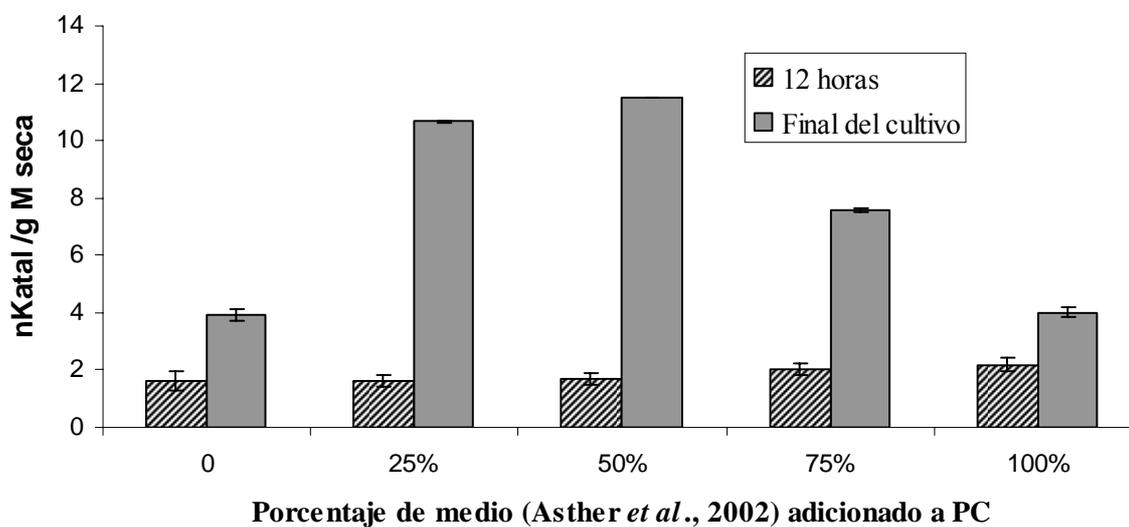


Figura 6.18 Actividad enzimática FAE utilizando como sustrato etil ferulato.

Las condiciones de cultivo en donde se encontró la mayor actividad enzimática serán de utilidad para establecer el siguiente ensayo que consiste en determinar los parámetros cinéticos

del cultivo sólido de PC para la producción de la AFAE, este análisis se realizó con un tiempo de reacción de 60 min para ambos sustratos.

Se observa mayor afinidad por el MF como sustrato para la actividad enzimática que por EF, esto ha sido reportado por otros autores que han demostrado que diferencias de los valores de la actividad enzimática respecto al éster que se utilice.

6.4.4 Cinéticas de fermentación

En la Figura 6.19 se presenta la producción de CO₂ de la FMS con el medio seleccionado (50% medio Asther, 65% humedad, 30 °C, inóculo 2x10⁷ esporas/g de materia seca) y la velocidad de producción de CO₂.

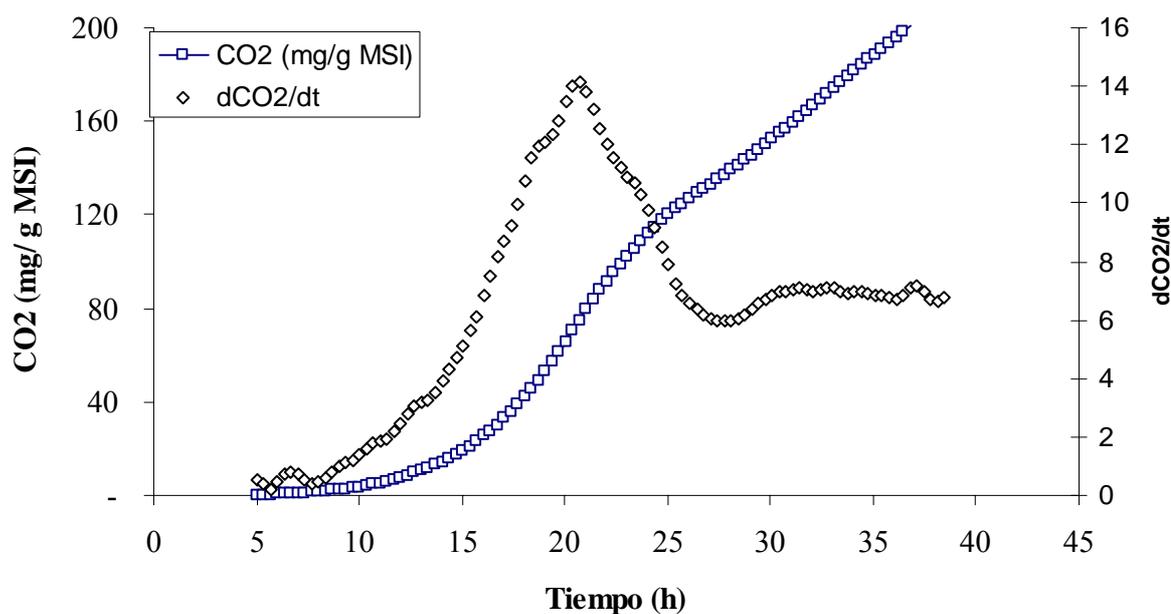


Figura 6.19 Producción de CO₂ con respecto al tiempo de la FMS con el medio seleccionado.

En la Figura 6.20 se presenta el ln del CO₂ contra el tiempo utilizando los valores obtenidos en la FMS con el medio seleccionado, se calculó una velocidad específica de

crecimiento (μ_{CO_2}) de 0.25 ± 0.011 y un tiempo de germinación (t_{lag}) de 14.3 ± 2.2 ($P < 0.0001$ en Anova unifactorial). Estos resultados son similares a los obtenidos en el experimento anterior.

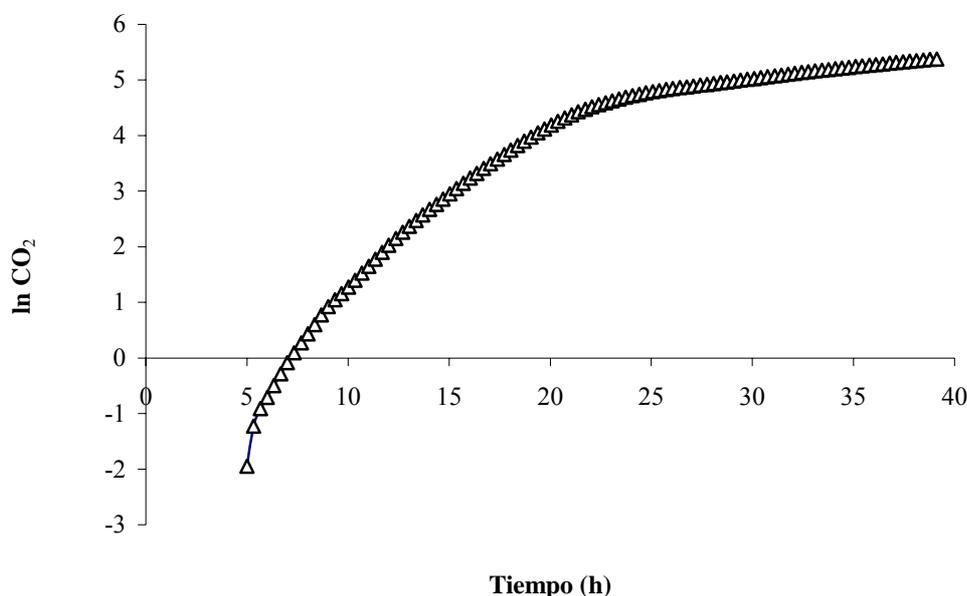


Figura 6.20 Estimación de la tasa específica respectiva (μ_{CO_2}) a través del CO_2 total producido con respecto al tiempo de la FMS con el medio seleccionado.

A la PC fermentada se le analizó la humedad y actividad de agua (Figura 6.21). Ambas disminuyeron durante las primeras 10 h de fermentación pero a partir de este tiempo comenzó a aumentar, esto puede deberse a la liberación de agua durante la respiración del cultivo.

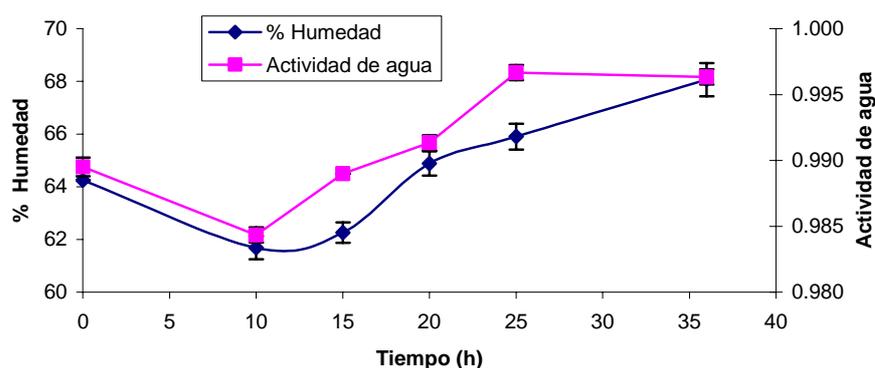


Figura 6.21 Variación de la humedad y actividad de agua durante el cultivo en medio sólido de *Aspergillus tamaritii* V12307 cultivada en pulpa de café adicionada con medio (Asther *et al.*, 2002).

Se analizaron los azúcares totales durante el cultivo y se expresaron como equivalentes de glucosa. Se encontró que la concentración de azúcares disminuyó en los extractos entre las 10 y 25 h de cultivo en un 60% (Figura 6.22). A las 36 horas de incubación cuando se observa un aumento, que coincide con el tiempo donde la actividad enzimática es mayor, esto sugiere que hay enzimas pectinolíticas que actúan sobre la pared celular de la pulpa de café.

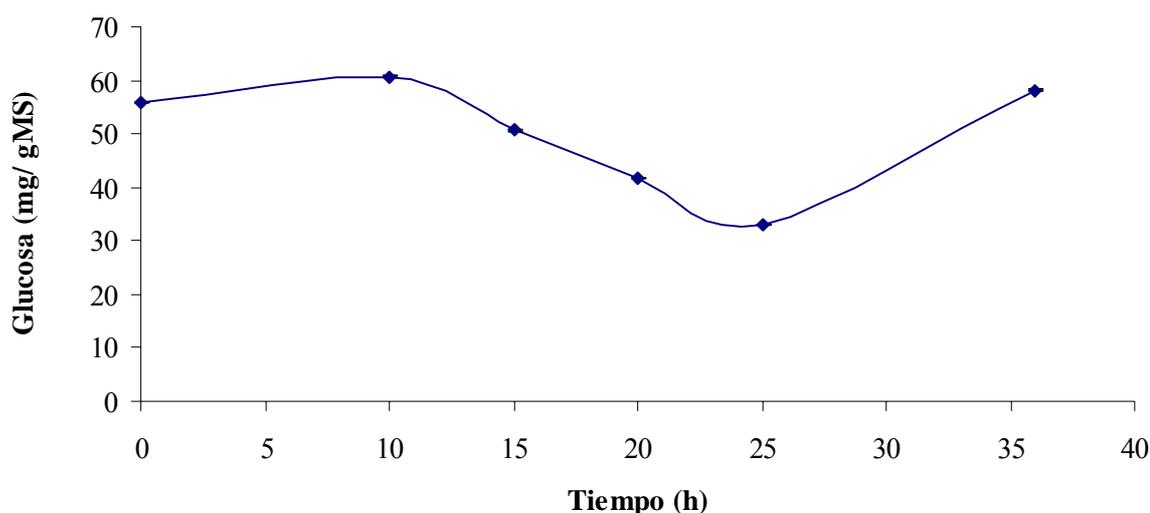


Figura 6.22 Variación de azúcares totales durante el cultivo en medio sólido de *Aspergillus tamarii* V12307 cultivada en pulpa de café adicionada con medio (Asther *et al.*, 2002).

Se observa como aumenta el contenido de glucosa en el extracto enzimático a las 36 horas de incubación, siendo la actividad enzimática máxima para ese tiempo, por lo se podría deducir que la enzimas que degradan la pared celular están liberado azúcares en ese tiempo y es posible liberar compuestos que logren inducir la AFAE.

La actividad enzimática analizada utilizando como substrato al metil ferulato con respecto al tiempo se incrementó a mayor tiempo de fermentación. Encontrándose la mayor actividad enzimática a las 36 h de cultivo, este análisis fue realizado con un tiempo de reacción de 15 min (Figura 6.23).

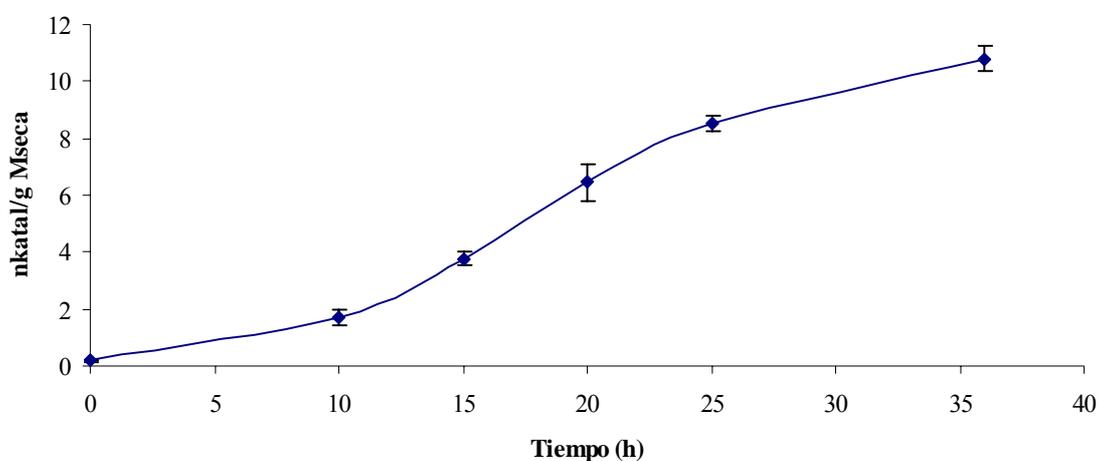


Figura 6.23 Análisis de actividad enzimática FAE a diferentes tiempos de cultivo.

La actividad enzimática FAE es mayor a la 36 h de fermentación, tiempo en que se observa un aumento en la liberación de azúcares en el extracto enzimático, cumple con reportado por trabajos anteriores, donde se dice que existe una sinergia entre las enzimas que liberan azúcares de la pared celular de las plantas y la FAE

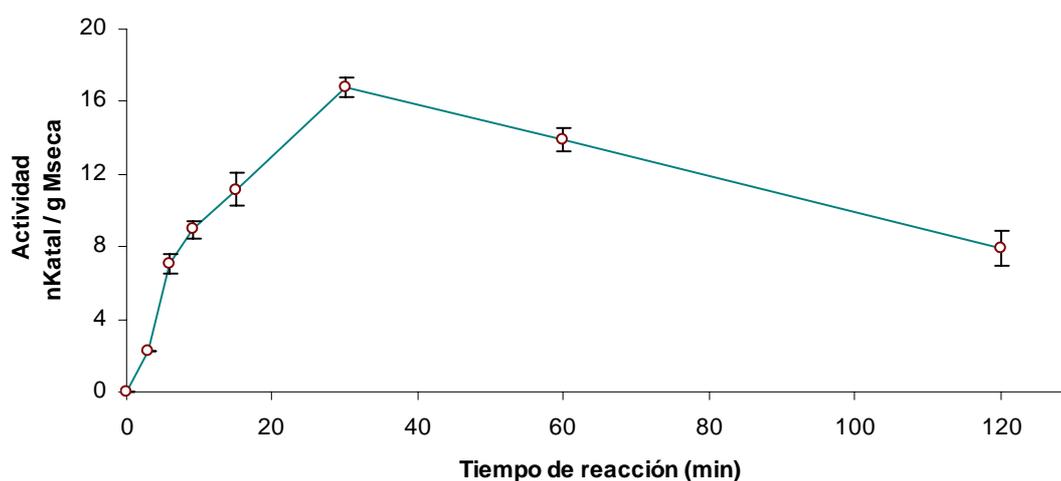


Figura 6.24 Actividad enzimática a diferentes tiempos de reacción con metil ferulato

En esta parte del trabajo experimental podemos concluir que *Aspergillus tamaris* V12307 presenta AFAE. Esta actividad en un principio fue determinada por un método sencillo como es

la cromatografía en capa fina y posteriormente fue confirmada por una técnica cuantitativa y sensible como es el HPLC.

La cepa de *Aspergillus tamaris* V12307 produjo AFAE en FMS, encontrando valores similares a lo reportado por Asther *et al.* (2002) aunque utilizando pulpa de remolacha azucarera, lograron obtener una actividad de 5 nkatal/gMS para el metil ferulato y una actividad de 19.5 nkatal/gMS con el metil sinapato. Mientras que lo reportado por este trabajo alcanza una actividad de 10.8 nkatal/gMS para el metil ferulato en 15 min de reacción. Sin embargo lo relevante del presente trabajo es que se logró a un menor tiempo de fermentación y la reducción del medio en un 50 %. Lo reportado por Asther *et al.*, 2002 tiene una productividad de 1.25 nkatal/gMS .dia Por otra parte, la mayor actividad enzimática reportada en FMS ha sido en el hongo *Penicillium brasillium* con una valor de 26 nkatal/ gMS (Panagiotou *et al.*, 2006).

También, las condiciones de cultivo utilizadas permitieron la producción de la FAE por parte del microorganismo estudiado y la pulpa de café se vuelve un sustrato de interés para su uso en la producción de la enzima, siendo esta conclusión uno de los principales objetivos de este trabajo. Por otra parte, el monitoreo en línea de la respiración de las fermentaciones permitió conocer las diferentes fases del cultivo mediante la producción de CO₂ que se asocia con el crecimiento para el cultivo de la cepa en estudio y los análisis de actividad enzimática permitieron encontrar las mejores condiciones para la producción de la enzima.

Antier *et al.* (1993) encontraron que la mayor producción de las enzimas pectinolíticas se presentó después de 3 días de cultivo utilizando PC como sustrato, también mencionaron que la humedad óptima fue de 65 % para fermentación sólida de la pulpa de café, esto coincide con lo reportado por Brand *et al.* (2000). En nuestro estudio las primeras fermentaciones se hicieron al 70 % de humedad como lo reportan Asther *et al.* (2002), pero se encontraron problemas de escurrimiento del medio de cultivo, por lo que redujo la humedad a 65 %.

Asimismo, Antier *et al.* (1993) demostraron que la adición de pequeñas cantidades de azúcares en la fermentación de pulpa de café mejoró la producción de pectinasa, estos resultados coinciden

con los nuestros en el sentido que la adición nutrientes (50%) del medio reportado por Asther (2002) estimuló la producción de FAE.

Por otro lado, Panagiotou *et al.* (2006) demostraron la influencia del medio de cultivo sobre la AFAE en la FMS usando residuos de cervecería. En nuestro estudio también se observó el efecto de los nutrientes del medio sobre la actividad enzimática. Cabe señalar, que Panagiotou *et al.* (2006) observaron la influencia de la humedad, pH, temperatura y contenido de nitrógeno sobre la AFAE, lo cual deja perspectivas de estudio para la producción del extracto enzimático a partir de PC.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CAPÍTULO 7

7. Conclusiones y perspectivas

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

La extracción de los AH no esterificados a la PC se obtuvo con una mezcla de metanol-agua (80:20), los compuestos extraídos principalmente fueron ácido caféico y *p*-cumárico, que inhiben la actividad FAE, y en menor proporción se obtuvo AF. Este procedimiento permitió utilizar PC sólo con los AH ligados a la pared celular convirtiéndose en un sustrato potencial para liberación de estos compuestos. En esta primera etapa se logró cuantificar la concentración de AH no ligados a la pared celular

El análisis del efecto de los factores tiempo y temperatura sobre la extracción de los AH libres por MSR permitió optimizar estos dos factores encontrando que a un tiempo de 35 minutos y una temperatura de 55 °C la extracción fue mayor para cada uno de los compuestos estudiados (mg/Kg de PC seca): ácido clorogénico, 77.1; ácido caféico, 9.08; ácido *p*-cumárico, 3.10; y ácido ferúlico, 2.74. De igual forma estas condiciones resultaron mejor para extraer los azúcares totales (5.63 g de hexosas/Kg de PC seca) y además se obtuvo una pérdida de peso de la PC de 142.4 mg/Kg de PC seca.

Por otra parte, metodología de formación de halos de hidrólisis y los medios selectivos permitió seleccionar a la cepa de *Aspergillus tamarii* V12307 que presentó AFAE y pectinasa, esto permite tener una cepa con potencial para hacer estudios en PC para la producción de la enzima FAE por FMS.

La cepa de *Aspergillus tamarii* V12307 produjo AFAE en FMS, encontrando valores similares a lo reportado por Asther y colaboradores (2002) aunque utilizando pulpa de remolacha azucarera. Y además se logró a un menor tiempo de fermentación y la reducción del medio en un 50 %.

En el análisis de azúcares totales se observa como va disminuyendo el contenido de azúcares con respecto al tiempo, y es a las 36 horas de incubación cuando se observa un aumento, también es el tiempo donde la actividad enzimática es mayor, por lo cual se podría sugerir que hay enzimas que liberan ácido galacturónico, y actúan sobre la pared celular de la pulpa de café.

Los análisis de la actividad enzimática a diferentes tiempos de fermentación demostraron que tiene influencia en la producción de la actividad enzimática. También se encontró que extracto enzimático obtenido de *Aspergillus tamaris* V12307 mostró mayor afinidad por el éster de ácido ferúlico metil ferulato con respecto al etil ferulato, siendo mayor la actividad para el primero en un 20 % con respecto al segundo sustrato.

La AFAE en el extracto obtenido en condiciones de 30 °C, con un tiempo de incubación de 36 horas utilizando PC como sustrato sólido adicionado con un medio mineral con maltosa en proporción 50 %, v/v, alcanza un máximo de actividad enzimática a los 30 min de reacción con metil ferulato y posteriormente empieza a disminuir.

Finalmente, el interés de este trabajo, que consiste en la liberación de compuestos con actividad antioxidante y precursores de aromas a través de la producción de enzimas tipo FAE y pectinasa, como el ácido ferúlico, el *p*-cumárico y caféico, a partir de residuos agro-industriales como la PC puede ser llevada a cabo con la cepa utilizada en este estudio. De esta manera, tanto *Aspergillus tamaris* V12307 como las condiciones establecidas para la producción de la AFAE por FMS serán de utilidad para estudios posteriores.

REFERENCIAS

CAPÍTULO 8

8. REFERENCIAS

1. Aliwan F.O., Kroon P.A., Faulds C.B., Pickersgill R., Williamson G. (1999). Ferulic acid esterase-III from *Aspergillus niger* does not exhibit lipase activity. *J Sci. Food Agric.* 79: 457-459.
2. Antier P., Minjares A., Roussos S., Raimbault M., Viniestra González G. (1993). Pectinase-hyperproducing mutants of *Aspergillus niger* C28B25 for solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Micro. Technol.* 15: 254-260.
3. 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* 38: 685-691.
4. Avallone S., Guiraud J.-P., Guyot B., Olguin E., Brillouet J.-M.. (2001). Fate of Mucilage Cell Wall Polysaccharides during Coffee Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5556 - 5559.
5. Barreto Castro M.R. (2001). Utilización de pulpa de café como complemento en dietas para crías de tilapia *Oreochromis niloticus*. Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
6. 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 compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Research* 341:1820-7.
7. Biely P., Mastihubova M., Van Zyl W.H., Prior B.A. (2002) Differentiation of feruloyl esterases on synthetic substrates in α -arabinofuranosidase-coupled and ultraviolet-spectrophotometric assays. *Analytical Biochemistry* 311:68–75.
8. Bonilla F., Mayen M., Merida J., Medina. M. (1999). Extraction of phenolic compounds from red grape marc for use as food lipid antioxidants. *Food Chemistry* 66: 209-215.
9. Bonnin E., Saulnier L., Brunel M., Marot C., Lesage-Meessen L., Asther M., Thibault J-F. (2002). Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading

- enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 1000-1005.
10. Brand D., Pandey A., Roussos S., Soccol C. R. (2000). Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 127-133.
 11. Crepin V.F., Faulds C.B., Connerton I.F. (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 647-652.
 12. De Vries R.P. y Visser J. (1999). Regulation of the feruloyl esterase (*faeA*) gene from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (12): 5500–5503.
 13. De Vries R.P. y Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 65: 497–522.
 14. Donaghy J.A., Kelly P.F., McKay A.M. (1998). Detection of ferulic acid esterase production by *Bacillus* spp. and lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 257-260.
 15. Donaghy J.A. y Mckay A.M. (1994). Novel screening assay for the detection of phenolic acid esterases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10: 41-44.
 16. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28:350-356
 17. Faulds C.B. y Williamson G. (1995). Release of ferulic acid from wheat bran by a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:1082-1087
 18. Faulds C. B., Ronald P. de Vries, Paul A. Kroon, Jaap Visser, Gary Williamson. (1997). Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiology Letters* 157: 239-244
 19. Faulds C.B. y Williamson G. (1999a). Review, the role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *J. Sci. Food Agric.* 79: 393-395

20. Faulds B.C. y Williamson G. (1999b). Effect of hydroxycinnamates and benzoates on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *J. Sci. Food Agric.* 79: 450-452.
21. Gaime- Perraud I, Roussos S., Martínez-Carrera D. (1993). Natural microorganisms of the fresh coffee pulp. *Micol. Neotro. Apl.* 6: 95-103.
22. Gallardo C., Jiménez L., García-Conesa M.T. (2006). Hydroxycinnamic acid composition and in vitro antioxidant activity of selected grain fractions. *Food Chemistry* 99: 455-463.
23. Grabber J.H, Hatfield R.D., Ralph J. (1998). Diferulate cross-links impede the enzymatic degradation of non-lignified maize walls. *J. Sci. Food Agric.* 77: 193-200.
24. Gutiérrez-Sánchez G. (2000). Degradación de cafeína en presencia de ácido tánico, por *Penicillium commune*, V33A25. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
25. Hegde S., Kavitha S., Varadaraj M.C., Muralikrishna G. (2006). Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid complexes by *Aspergillus niger* CFR 1105. *Food Chemistry* 96: 14-19.
26. Hermoso J.A., Sanz-Aparicio J., Molina R., Juge N., González R., Faulds C.B. (2004). The crystal structure of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* suggests evolutive functional convergence in feruloyl esterase family. *J. Mol. Biol.* 338: 495-506.
27. Herrera-García O. (2003). Obtención y selección de cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de fitasa. Tesis de Maestría en Biotecnología. Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
28. Iiyama K., Lam T.B.T, Stone B.A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physio.* 104: 315-320.
29. Ishii T. (1997). Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science* 127: 111-127.

30. Kim K.-H., Tsao R., Yang R., Cui S.W. (2006) Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry* 95: 466-473.
31. 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.* 79: 428-434.
32. Kroon P.A. y Williamson G. (1999). Hidroxicinnamates in Plants and Food: Current and Future Perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 79: 355-361.
33. Labat M., Augur C., Río B., Perraud-Gaime I., Sayadi S. (2000). Biotechnological potentialities of coffee and similar with olive, two models of agroindustrial products rich in polyphenolic compounds: a review. *Coffee Biotechnology and Quality*.
34. Laszlo J.A., Compton D.L., Li X.L. (2006). Feruloyl esterase hydrolysis and recovery of ferulic acid from jojoba meal. *Industrial Crops and Products* 23: 46-53.
35. McAuley K.E., Svendsen A., Patkar S.A., Wilson K. S. (2004). Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Cryst.* 60: 878-887.
36. Mackenzie C.R. y Bilous D. (1998). Ferulic acid esterase activity from *Schizophyllum commune*. *Applied and Environmental Microbiology* 1170-1173.
37. Martínez-Valverde I., Periago M.J., Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 50: 5-18.
38. Mastihuba V., Kremnický L., Mastihubová M., Willett J.I., Côté G.L. (2002). A spectrophotometric assay for feruloyl esterases. *Analytical Biochemistry* 309: 96-101.
39. Montgomery D.C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. Grupo Editorial Iberoamérica. México D.F.
40. Naczk M. y Shahidi F. (2004). Review action and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A* 1054: 95-111.

41. Nava Villagómez J.I. (2003). Fermentación de pulpa de café con *Penicillium commune* a nivel laboratorio y semi-piloto. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

42. Panagiotou G., Granouillet P., Olsson L. (2006). Production and partial characterization of arabinoxylan-degrading enzymes by *Penicillium brasilianum* under solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 1117–1124.

43. Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D. (2000a). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* 35: 1153-69.

44. 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* 6: 153-162.

45. Peñaloza W., Molina R.M., Gómez-Brenes R., Bressani R. (1985). Solid-state fermentation: An alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(2): 388-393.

46. Ramírez-Coronel M.A., Mannet N., Kolli V.S., 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. *J. Agric. Food Chem.* 52: 1344-1349.

47. Ramírez-Martínez J.R., Pernia, R.D., Bautista, E.O., Clifford, M.N., Adams, M.R. (2000). Producción y caracterización de la pulpa de café ensilada. En: Pulpa de café ensilada. Editor Ramírez-Martínez, J.R. pp 11-29.

48. Rojas, Natalia Lorena (2004). Hongos alcalino-tolerantes como potencial fuente de enzimas de interés biotecnológico. Tesis de Licenciatura en Biotecnología. Universidad Nacional de Quilmes. Quilmes, Argentina.

49. Ruíz, P. (2002). Producción de cafeoil, feruol y *p*-cumarol esterasas por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
50. Saija, A., Tomaino A., Lo Cascio R., Trombetta D., Proteggente A., De Pasquale A., Uccella N., Bonina, F. (1999). Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J. Sci. Food Agric.* 79: 476-480
51. Salmones D., Mata G., Waliszewski, K.N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: Biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology* 96: 537-544.
52. Sancho A. I., Bartolome B., Gómez-Cordovés C., Williamson G., Faulds C.B. (2001). Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *Journal of Cereal Science* 34: 173-179.
53. Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández, M.R., Lonsane B.K., Navarro J.M., Roussos S., Raimbault, M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO₂ and O₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry* 29: 13-24.
54. Saulnier L. y Thibault. (1999). Review. Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.* 79: 396-402.
55. Schroeter H, Williams RJ, Matin R, Iversen L., Rice-Evans CA. (2000), Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. *Free Radical Biol. Med.* 29: 1222-33.
56. Suzuki A. (1999). Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas para la conservación de pulpa de café por ensilaje. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
57. Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. (2003). Bioconversion of ferulic acid into vanillic acid by the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 36: 561-565.

58. Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P. (2005). *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): Purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 729–736.
59. Topakas E., Vafiadi C., Christakopoulos P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry* 42: 497-509.
60. Ulloa J.B., Verreth J.A.J., Amato S., Huisman E.A. (2003). Biological treatments affect the chemical composition of coffee pulp. *Bioresource Technology* 89: 267-274.
61. Urbaneja G., Ferrer J. R., Páez G., de Moreno L.A., Colina G., Sandoval L. (1997). Hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. *Rev. Fac. Agron.* 14: 265-275.
62. Vásquez, R. (1999). El beneficiado ecológico del café. En: Desafíos de la cafeticultura en centroamérica. Bertrand, B. y Rapidel, B. (Eds)171-191 pp.
63. 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* 13: 157-167.
64. Waterman P.G. y Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
65. Williamson G., Kroon, P. A., Faulds C.B. (1998a). Hairy plant polysaccharides: A close shave with microbial esterases. *Microbiology* 144: 2011–2023.
66. Williamson G., Faulds C.B., Kroon P.A. (1998b). Specificity of ferulic acid (feruloyl) esterase. *Biochemical Society Transactions* 26: 205-209
67. Yegres S., Sánchez J., Belmar M., Riveros W., Belmar D. (2001). Producción de enzimas pécticas ensayos preliminares. *Saber, Universidad de Oriente Venezuela* 13 (1): 55-59.

Fuentes electrónicas:

68. <http://www.biologia.edu.ar>

ANEXOS

CAPÍTULO 9

9. ANEXOS

A1. Medios de cultivo

Medio Asther 2002	(g/l)
Tartrato diamonio	12.3
Extracto de levadura	3.4
KH ₂ PO ₄	1.3
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.09
MgSO ₄ 7H ₂ O	3.3
Maltosa	16.7
Pulpa de café	100

Medio 0.75 Asther 2002	(g/l)
Tartrato diamonio	9.2
Extracto de levadura	2.5
KH ₂ PO ₄	0.97
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.06
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.4
Maltosa	12.5
Pulpa de café	100

Medio 0.5 Asther 2002	(g/l)
Tartrato diamonio	6.1
Extracto de levadura	1.7
KH ₂ PO ₄	0.65
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.04
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.65
Maltosa	8.3
Pulpa de café	100

Medio 0.25 Asther 2002	(g/l)
Tartrato diamonio	3.0
Extracto de levadura	0.85
KH ₂ PO ₄	0.3
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.02
MgSO ₄ 7H ₂ O	13.2
Maltosa	4.1
Pulpa de café	100

A2 SECUENCIA

Cepa V12307

Secuencia ITS1-5.8S-ITS2

```
AAAACCGGAGTGGGGTTCTAGCGAGCCACCTCCCACCCGTGTTTACTGTAACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCCG  
CCTTTAAGGCCCGCGGGGGGCATCAGCCCCGGGCCCCGCGCCCGGAGACACCACGAACCTGTCTGATCTAG  
TGAAGTCTGAGTTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTCAACAATGGATCTCTTGGTCCGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC  
CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTC  
GTCCCTCTTCGGGGGGGACGGGCCCAAAGGCAGCGGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTT  
GTCACCCGCTCTGTAGGCCCGCGCGCTTGCCGAACGCAAAAACAACCATTTCCAGGTTGACCTCGGATCA  
GGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATACGCGGAGGAATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCC  
AACCTCCCACCCGTGTTTACTGTAACCTTAGTTGCTTCGGCGGSCCCGCCTTTAAGGCCCGCGGGGGGCATCAGCC  
CCGGGGCCGCGCCGCAAGAGAACCAAGAGTTGTCTGACTRAGCAGCTGACTTGATGAACGCATCGTAAAAATTC  
AACAGGGAACTTGGGTCCGGCCCCAAAAAAACCCCAAAC
```

ID Genbank

Por ITS:

Aspergillus tamaris isolate NRRL 4911 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Identities = 565/571 (98%)

Se analizaron además 548 nucleótidos de la región D1/D2 del gen 18S rRNA. La cepa pertenece al género *Aspergillus*, su linaje es:

Reino: *Fungi*

División: *Ascomycota*

Clase: *Ascomycetes*

Orden: *Eurotiales*

Familia: *Trichocomaceae*

Género: *Aspergillus*

Especie: *tamaris*

A3. ANÁLISIS DE VARIANZA

PÉRDIDA DE PESO (g/Kg PCseca)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9340
Coefficiente de determinación R ²	0.8724
R ² ajustado	0.8420
Error típico	1.8896
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	5	512.75	102.55	28.72	1.03E-08
Residuos	21	74.98	3.57		
Total	26	587.73			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	125.836	22.709	5.541	< 0.0001
Tiempo	0.862	0.402	2.142	0.044
Temperatura	-0.486	0.945	-0.514	0.612
Tiempo ²	-0.014	0.006	-2.185	0.040
Temperatura ²	0.009	0.010	0.902	0.377
Tiempo*Temperatura	0.001	0.007	0.102	0.919

 ÁCIDO CLOROGÉNICO (g/Kg PCseca)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9539
Coefficiente de determinación R ²	0.9099
R ² ajustado	0.8884
Error típico	4.7271
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	5	4738.55	947.71	42.41	2.82E-10
Residuos	21	469.26	22.35		
Total	26	5207.81			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	-125.667	56.811	-2.212	0.038
Tiempo	3.548	1.006	3.526	0.002
Temperatura	5.308	2.363	2.246	0.036
Tiempo ²	-0.040	0.016	-2.492	0.021
Temperatura ²	-0.042	0.026	-1.618	0.121
Tiempo*Temperatura	-0.020	0.017	-1.158	0.260

 ÁCIDO CAFÉICO (g/Kg PCseca)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9490
Coefficiente de determinación R ²	0.9005
R ² ajustado	0.8768
Error típico	0.4521
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	5	38.85	7.77	38.01	7.87E-10
Residuos	21	4.29	0.20		
Total	26	43.14			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	13.060	5.433	2.404	0.026
Tiempo	0.058	0.096	0.598	0.556
Temperatura	-0.502	0.226	-2.219	0.038
Tiempo ²	0.000	0.002	-0.288	0.776
Temperatura ²	0.007	0.002	2.693	0.014
Tiempo*Temperatura	0.001	0.002	0.549	0.589

 ÁCIDO COUMÁRICO (g/Kg PCseca)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9533
Coefficiente de determinación R ²	0.9088
R ² ajustado	0.8871
Error típico	0.1577
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	5	5.21	1.04	41.859	3.19E-10
Residuos	21	0.52	0.02		
Total	26	5.73			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	10.054	1.896	5.303	< 0.0001
Tiempo	0.015	0.034	0.448	0.659
Temperatura	-0.417	0.079	-5.290	< 0.0001
Tiempo ²	-0.001	0.001	-1.635	0.117
Temperatura ²	0.005	0.001	5.476	0.000
Tiempo*Temperatura	0.001	0.001	1.885	0.073

 ÁCIDO FERÚLICO (g/Kg PCseca)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9801
Coefficiente de determinación R ²	0.9607
R ² ajustado	0.9513
Error típico	0.1081
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	5	6.00	1.20	102.59	5.03E-14
Residuos	21	0.25	0.01		
Total	26	6.24			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	4.618	1.299	3.554	0.002
Tiempo	-0.056	0.023	-2.452	0.023
Temperatura	-0.190	0.054	-3.520	0.002
Tiempo ²	0.001	0.000	2.286	0.033
Temperatura ²	0.002	0.001	3.966	0.001
Tiempo*Temperatura	0.001	0.000	3.151	0.005

AZÚCARES TOTALES (g/Kg PCseca)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9446
Coefficiente de determinación R ²	0.8922
R ² ajustado	0.8666
Error típico	0.3082
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	5	16.52	3.30	34.78	1.80E-09
Residuos	21	2.00	0.10		
Total	26	18.51			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	0.220	3.704	0.059	0.953
Tiempo	0.128	0.066	1.956	0.064
Temperatura	0.022	0.154	0.140	0.890
Tiempo ²	-0.001	0.001	-0.910	0.373
Temperatura ²	0.001	0.002	0.416	0.682
Tiempo*Temperatura	-0.001	0.001	-0.599	0.555

AZÚCARES TOTALES (g/Kg PCseca)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coefficiente de correlación múltiple	0.9370
Coefficiente de determinación R ²	0.8780
R ² ajustado	0.8679
Error típico	0.3068
Observaciones	27

ANÁLISIS DE VARIANZA

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	2	16.256	8.128	86.38	1.08E-11
Residuos	24	2.258	0.094		
Total	26	18.514			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	-0.267	0.383	-0.696	0.493
Tiempo	0.060	0.006	9.558	< 0.0001
Temperatura	0.072	0.008	9.022	< 0.0001

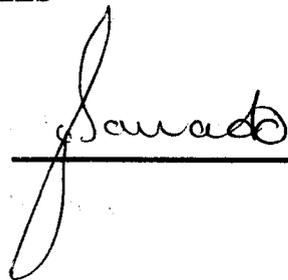
Iztapalapa, D.F. a 13 de agosto de 2008

El jurado designado por la
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa
aprobó la tesis

**PRODUCCIÓN DE ENZIMAS TIPO FERULOIL ESTERASA POR
FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO
EN PULPA DE CAFÉ**

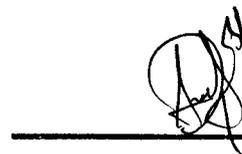
Que presentó
GLADYS GABRIELA PÉREZ MORALES

Director:
Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



JURADO

Asesor:
Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Asesor:
Dr. Francisco Cruz Sosa
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Sinodal:
Dr. Christopher Augur
IRD, Université Paul Cézanne (Aix-Marseille III)



Sinodal:
Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Universidad Autónoma del Estado de Coahuila

