

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



CASA ABIERTA AL TIEMPO  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

BIOTRANSFORMACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS POR HONGOS DEL  
GÉNERO *Aspergillus*

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

M. en B. Itzamná Baqueiro Peña

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda	Director
Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano	Asesora
Dr. Eduardo González Zamora	Asesor

Julio de 2010

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo

Trabajo financiado por CONACyT 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)

México D.F. a 5 de julio del 2010

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

BIOTRANSFORMACIÓN DE ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS POR HONGOS  
DEL GÉNERO *Aspergillus*

que presentó

Itzamná Baqueiro Peña

Comité Tutorial:

Director: Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Asesora: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

Asesor: Dr. Eduardo González Zamora

Jurado:

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Secretario: Dr. José Ramón Verde Calvo

Vocal: Dra. Isabelle Gaime- Perraud

Vocal: Dr. Eduardo González Zamora

---

*A mi hija Akame Torhí, siempre en mi mente y mi corazón.*

*A Sarah, Leonardo Máximo y Adrián, son mi cielo en la tierra.*

*A mis hermanas, mi tía Eva y mis padres, los pilares*

*Al principio  
vienen necesariamente a la mente  
la fantasía y la fábula.  
Desfilan después los cálculos  
y sólo al final  
la realización corona el pensamiento  
Konstantin Tsołkovski*

---

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el financiamiento otorgado a este trabajo por el CONACyT y a los recursos del Fondo Sectorial SAGARPA.

A la UAMI, a la Université Paul Cézanne y al IRD, por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, le agradezco el haberme apoyado y guiado en estos años.

Al Dr. Eduardo González Zamora y a la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano les agradezco sus enseñanzas y consejos.

Al Dr. Octavio Loera Corral y al Dr. José Ramón Verde Calvo por el tiempo dedicado a este proyecto, por sus comentarios y sugerencias.

A la Dra. Isabelle Gaime -Perraud, por ayudarme a contar el final de mi historia. Le agradezco de todo corazón el haberme brindado su ayuda, tiempo y amistad.

A mis compañeros de la PP4, del R001, del IMPEP.

Un agradecimiento a todos los que participaron e hicieron posible la realización y culminación de este proyecto.

Christopher, un comienzo no desaparece nunca, ni siquiera con un final, gracias por tu paciencia, tus enseñanzas y tu amistad.

**INDICE**

Índice de unidades símbolos y abreviaturas.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	15
1. Introducción.....	19
2. Antecedentes.....	23
2.1 Compuestos fenólicos.....	23
2.1.1 Fenoles simples.....	24
2.1.2 Ácidos fenólicos y aldehídos.....	25
2.1.3 Acetofenonas y ácidos fenilacéticos.....	26
2.1.4 Cumarinas.....	26
2.1.5 Flavonoides.....	26
2.1.6 Biflavonilos.....	27
2.1.7 Benzofenonas, xantonas y estilbenos.....	27
2.1.8 Benzoquinonas, antraquinonas y naftaquinonas.....	28
2.1.9 Betacianinas.....	28
2.1.10 Lignanos.....	29
2.1.11 Taninos.....	29
2.1.12 Flobafenos.....	30
2.2 Ácidos hidroxicinámicos.....	30
2.3 Antioxidantes y aromas.....	33
2.4 Comparación entre fermentación en medio sólido y fermentación en medio líquido.....	35
2.5 Biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos.....	38
2.5.1 Biotransformación del ácido ferúlico.....	38
2.5.2 Biotransformación del ácido <i>p</i> -cumárico.....	42
2.5.3 Biotransformación del ácido caféico y clorogénico.....	43
2.6 Trabajos realizados sobre la pulpa de café.....	44
3. Justificación.....	47
4. Hipótesis.....	49
4.1 Objetivos.....	49
4.1.1 Objetivo general.....	49

---

4.1.2 Objetivos específicos.....	49
5. Materiales y métodos .....	51
5.1 Reactivos.....	51
5.2 Microorganismos .....	51
5.3 Medios de cultivo.....	52
5.3.1 Medio café.....	52
5.3.2 Medio pulpa de café .....	52
5.3.3 Medio A .....	53
5.3.4 Medio B .....	53
5.4 Selección de cepas .....	53
5.4.1 Cultivo para la fermentación en medio líquido.....	53
5.4.2 Extracto para la identificación de compuestos .....	54
5.5 Cultivo en fermentación en medio sólido (FMS).....	54
5.6 Preparación del inóculo.....	54
5.7 Producción del extracto crudo de la cepa <i>A. niger</i> DAR 2.....	55
5.8 Tratamiento de las muestras .....	55
5.8.1 Fermentación en medio líquido (FML).....	55
5.8.2 Fermentación en medio sólido (FMS).....	56
5.8.3 Extracto para la identificación de compuestos .....	56
5.9 Técnicas analíticas.....	56
5.9.1 Cromatografía en capa fina (CCF) .....	56
5.9.2 Cromatografía preparativa (CP). .....	57
5.9.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	58
Análisis de compuestos fenólicos.....	58
Análisis de azúcares .....	59
5.9.4 Cromatografía de gases (CG). .....	59
Cromatografía de gases acoplada al detector de masas. ....	59
Determinación de CO <sub>2</sub> .....	60
5.9.5 Resonancia magnética nuclear .....	61
5.9.6 Determinación de biomasa.....	61
5.9.7 Determinación del pH .....	61
5.9.8 Determinación de amonio.....	62

---

---

5.9.9 Determinación de humedad .....	62
5.9.10 Determinación de la actividad de agua ( $A_w$ ) .....	62
5.9.11 Determinación de proteína .....	63
5.9.12 Determinación de la actividad enzimática ferúlico descarboxilasa en el extracto crudo de la cepa <i>A. niger</i> DAR 2 .....	63
5.9.13 Efecto del pH y temperatura en la actividad enzimática intracelular de la cepa <i>A. niger</i> DAR 2.....	64
5.9.14 Purificación por intercambio iónico de la enzima ferúlico- descarboxilasa de la cepa <i>A. niger</i> DAR 2 .....	64
5.9.15 Purificación por filtración en gel de la enzima ferúlico- descarboxilasa de la cepa <i>A. niger</i> DAR 2 .....	64
5.9.16 Análisis estadístico .....	65
5.10 Expresión de resultados .....	65
5.10.1 Rendimientos y conversiones molares en las reacciones de biotransformación.....	65
5.10.2 Análisis de gases de la fermentación en medio sólido .....	66
6. Selección de las cepas fúngicas con capacidad para biotransformar ácidos hidroxicinámicos.....	68
7. Biotransformación del ácido clorogénico en fermentación en medio líquido .....	77
7.1 Estudio preliminar de la biotransformación en cultivo líquido del ácido clorogénico por las cepas <i>A. niger</i> DAR 2 Y <i>A. niger</i> C23308.....	77
8. Biotransformación del ácido <i>p</i> -cumárico .....	84
8.1 Estudio preliminar de la biotransformación en cultivo líquido del ácido <i>p</i> - cumárico por las cepas <i>A. tamarisii</i> V12307, <i>A. niger</i> C17309 Y <i>A. niger</i> AD96-4 .....	85
8.2 Análisis del extracto de la biotransformación en fermentación en medio líquido del ácido <i>p</i> -cumárico por la cepa <i>A. niger</i> C17309. ....	87
8.3 Biotransformación en cultivo líquido del ácido <i>p</i> -cumárico por <i>A. tamarisii</i> V12307 con medio de cultivo A y B.....	90
8.3.1 Biotransformación en fml del ácido <i>p</i> -cumárico por la cepa <i>A. tamarisii</i> V12307 en el medio de cultivo A.....	90
8.3.2 Biotransformación en cultivo líquido del ácido <i>p</i> -cumárico por <i>A. tamarisii</i> V12307 en el medio B .....	94



---

8.4 Biotransformación en fermentación en medio sólido del ácido <i>p</i> -cumárico por <i>A. tamarii</i> V12307 con medio de A y B.....	100
9. Biotransformación del ácido ferúlico.....	106
9.1 Identificación del 4-vinilguayacol.....	106
9.2 Biotransformación en fermentación en medio líquido del ácido ferúlico por la cepa silvestre <i>A. niger</i> C28B25 y la cepa recombinante <i>A. niger</i> DAR2 en medios de cultivo A y B.....	110
9.3 Biotransformación del ácido ferúlico en fermentación en medio sólido por las cepas <i>A. niger</i> C28B25 Y <i>A. niger</i> DAR 2 en medios de cultivo A y B.....	116
9.4 Identificación y purificación parcial de la descarboxilasa responsable de la biotransformación del ácido ferúlico en 4-vinilguayacol de <i>A. niger</i> DAR 2....	128
9.4.1 Evaluación del pH y temperatura en el extracto enzimático intracelular de <i>A. niger</i> DAR 2. ....	130
9.4.2 Purificación parcial por intercambio iónico de la enzima ferúlico descarboxilasa de <i>A. niger</i> DAR 2.....	132
9.4.3 Purificación por filtración en gel de la enzima ferúlico descarboxilasa de <i>A. niger</i> DAR 2. ....	132
10. Conclusiones y perspectivas.....	136
Anexos.....	156
Anexo 1. Publicaciones y trabajos presentados en congresos.....	156
Anexo 2. Identificación de cepas fúngicas.....	163
Anexo 3. Curvas patrón de concentración de compuestos fenólicos.....	166
Anexo 4. Curvas patrón de concentración de azúcares.....	167
Anexo 5. Curva patrón de concentración de amonio.....	169
Anexo 6. Preparación de soluciones del método de Lowry.....	170
Anexo 6.1 Curva patrón de seroalbúmina para la determinación de proteína.....	170

## **INDICE DE UNIDADES SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

MA	Medio de cultivo A
MB	Medio de cultivo B
FML	Fermentación en medio líquido
FMS	Fermentación en medio sólido
MSI	materia sólida inerte
CM	Conversión molar
mM	milimolar
ml	mililitro
μl	microlitro
h	hora
g/l	gramos por litro
mg/l	miligramos por litro
cm	centímetro
nm	nanómetro
rpm	revoluciones por minuto
RM	Rendimiento molar
BM	biomasa
R <sub>f</sub>	Ratio front
ND	No detectado
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear del proton
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia magnética nuclear del carbono 13
GC-MS	Cromatografía de gases acomplado a detector de masa
ppm	partes por millón
Hz	Hertz
lag	Fase lag de crecimiento microbiano
A <sub>w</sub>	Actividad de agua
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
°C	Grados Celsius
UV	Ultra Violeta

## RESUMEN

En este estudio se biotransformaron ácidos hidroxicinámicos presentes en un subproducto agrícola mexicano como lo es la pulpa de café. Para llevar a cabo este estudio, se usaron mohos de la colección fúngica de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAMI) y de el Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Estas cepas fueron aisladas de las zonas cafetaleras de Veracruz y Chiapas (Roussos *et al.*, 1989).

Para el desarrollo de este trabajo, se tomó como vía de referencia la vía del ácido fenilpropenóico que es una vía del metabolismo secundario (Verpoorte, 2000).

Se encontró que las cepas aisladas del nicho biológico del café presentaron capacidad para biotransformar los ácidos hidroxicinámicos. De las 19 cepas estudiadas, sólo 8 cepas mostraron actividad, 7 del género *Aspergillus* y 1 del género *Penicillium*. Ninguna de estas 8 cepas, silvestre o modificadas mostraron la capacidad de biodegradar todos los sustratos con respecto a la vía de referencia hasta vainillina. Las cepas de hongos filamentosos utilizadas mostraron diferentes capacidades enzimáticas para biotransformar ácidos hidroxicinámicos en los intermediarios de esta vía, además que se obtuvieron otras moléculas interesantes (como el 4-vinilguayacol).

Se comparó la biotransformación en cultivo líquido y sólido con el ácido *p*-cumárico y ferúlico. Se encontró que el cultivo sólido mostró ser una herramienta interesante en el proceso de biotransformación del ácido ferúlico ya que en la producción del 4-vinilguayacol la producción fue de casi el doble al comparar con el cultivo líquido. Con el cultivo sólido, también se observó una generación de productos diferente, en el caso de la biotransformación del ácido ferúlico y *p*-cumárico.

Los estudios enzimáticos de la enzima ferúlico descarboxilasa del extracto de *A. niger* DAR 2, mostraron que la enzima es intracelular con un pH y temperatura óptima de 6 y 40°C, respectivamente y que posiblemente es una

enzima con un peso molecular aproximado de 91kDA. Este último dato deberá confirmarse posteriormente.

En el caso de la biotransformación del ácido clorogénico en cultivo líquido, se encontró que *A. niger* C23308 produjo 400 mg/l de ácido caféico y 24 mg/l de ácido protocatecico a las 36 h de biotransformación. Ambos productos reconocidos por su capacidad antioxidante. Por lo que podría ser aplicado en la pulpa de café, ya que la concentración del ácido clorogénico en este subproducto es de 3097 mg/kg.

La biotransformación del ácido *p*-cumárico en cultivo líquido por *A. tamaritii* V12307 con medio de cultivo A (altas concentraciones de azúcares), muestra que posiblemente el mecanismo de reacción es por medio de la degradación de la cadena propenóica para la formación del ácido *p*-hidroxibenzóico. *A. tamaritii* mostró una productividad de 5 mg/l h de ácido *p*-hidroxibenzóico de 2.5 veces mayor, comparada a la de *P. variotii* de 2 mg/l h (Sachan *et al.*, 2006)

La misma cepa *A. tamaritii* en cultivo líquido y medio de cultivo B (bajas concentraciones de azúcar), muestra la capacidad de generar el ácido caféico como se establece en la vía de referencia. Esta reacción de biotransformación sugiere la presencia de la enzima 4-cumarato-3-hidroxilasa en el microorganismo. La productividad alcanzada con esta cepa fue de 144 mg/ l d, 9 veces mayor que la obtenida con *P. cinnabarinus* de 16 mg/ l d (Estrada-Alvarado *et al.*, 2003).

En cultivo sólido, *A. tamaritii* V12307, biotransforma el ácido *p*-cumárico con rendimientos de 56% y 24%, con medio de cultivo A y B. en diversos compuestos, con medio A, sólo se produce un compuesto. Los productos obtenidos por cultivo sólido deberán ser identificados posteriormente.

*A. niger* C17309 en cultivo líquido biotransforma el ácido *p*-cumárico en intermediarios del hidroxibenzoato, generando compuestos de alto valor agregado como el 4-hidroxibenzaldehído, el metil-4- hidroxibenzoato, la

hidroquinona y el 4-propilfenolen en una proporción de 2.47%, 0.54%, 10.6%, 0.65%, respectivamente. La presencia de estos compuestos sugiere que las reacciones se dan a nivel de la cadena propenónica y no en el anillo aromático.

El ácido ferúlico en cultivo líquido es biotransformado por *A. niger* C28B25 por la vía de la degradación de la cadena propenónica en ácido vainillínico. Además, se observó una productividad en términos de mg/ l d de 3 veces mayor con *A. niger* C28B25 que la reportada con *P. variotii* MTCC 6581 (Ghosh *et al.*, 2006)

La biotransformación del ácido ferúlico en 4-vinilguayacol por *A. niger* DAR 2, se efectúa preferencialmente por la descarboxilación no oxidativa.

El cultivo sólido mostró ser una herramienta interesante en el proceso de biotransformación del ácido ferúlico en 4-vinilguayacol que tiene un valor de 40 veces mayor que el ácido ferúlico y que es ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica. En cultivo sólido la producción fue de casi el doble de 4 vinilguayacol que en cultivo líquido en una tercera parte del tiempo, también se observó una generación de productos diferente, ya que la cepa silvestre C28B25 en cultivo sólido biodegradó el ácido ferúlico en ácido caféico, mientras que en cultivo líquido no se observó este producto.

Un exceso de azúcares en el medio de cultivo puede inhibir de alguna manera la generación de productos y no sólo la presencia de azúcares de fácil asimilación, como ya estaba reportado (Ander *et al.*, 1980; Lesage Meesen *et al.*, 1997).)

En la vía de biotransformación del ácido ferúlico en cultivo sólido y líquido se presentan reacciones principalmente a nivel de la cadena propenónica, a excepción del cultivo sólido con la cepa silvestre C28B25, donde se observó una desmetilación del anillo.

El estudio de la purificación de la enzima ferúlico descarboxilasa a partir del extracto de *A. niger* DAR 2, mostró que la enzima es intracelular con un pH y

temperatura óptima de 6 y 40°C, respectivamente y que posiblemente es una enzima con un peso molecular aproximado de 91kDA. Este último dato deberá confirmarse posteriormente.

Los sistemas de biotransformación estudiados, podrían ser aplicados a la pulpa de café y también a otros subproductos agroindustriales con cantidades interesantes de ácidos hidroxicinámicos, para la obtención de antioxidantes y precursores de aromas naturales por haber sido obtenidos mediante procesos de biotransformación.

**ABSTRACT**

In this study hydroxycinnamic acids were biotransformed. These acids are present in mexican agricultural by-products such as coffee pulp. In order to fulfill this study, moulds from the Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAMI) and from the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) were used. These strains were isolated from Veracruz and Chiapas coffee plantations (Roussos et al., 1989).

For the development of this work, phenylpropenoic acid pathway was taken as a reference, which is a pathway from the secondary metabolism (Verpoorte, 2000).

It was found that isolated strains from coffee biological niche presented a capacity to biotransform hydroxycinnamic acids. From the 19 strains studied, only 8 strains showed activity, 7 *Aspergillus* strains and 1 *Penicillium*. None of these 8 strains, wild or modified showed the capacity to biodegrade all substrates with respect to the reference pathway all the way through vanillin. Strains from filamentous fungi used showed different enzymatic capacities to biotransform hydroxycinnamic acids in the intermediaries from this pathway, besides, other interesting molecules were obtained (such as 4-vinylguaiacol).

Biotransformation in liquid and solid culture with *p*-coumaric and ferulic acid was compared. It was found that solid culture is an interesting tool. In ferulic acid biotransformation process since 4-vinylguaiacol production was almost twice as much when comparing it with the liquid culture. With the solid culture, it was observed as well different products generation, in the case of *p*-coumaric and ferulic acid biotransformation.

Enzymatic studies from ferulic descarboxylase enzyme from *A. niger* DAR 2 extract, showed that the enzyme is intracellular with a pH and temperature optimal of 6 and 40 °C respectively and that possibly, it is an enzyme with an approximate molecular weight of 91kDA. This latter value must be confirmed in the future.

In the case of chlorogenic acid biotransformation in liquid culture, it was found that *A. niger* C23308 produced 400 mg/l from caffeic acid and 24 mg/l from protocatechuic acid at 36 hours of biotransformation. Both products are well known for their antioxidant capacity. This could be applied in coffee pulp, since chlorogenic acids concentration in this by-product is around 3097 mg/kg.

The *p*-coumaric acid biotransformation in liquid culture by *A. tamarii* V12307 with culture medium A (high sugar concentrations), shows that the mechanism reaction is possibly made by means of propenoic chain degradation for *p*-hydroxybenzoic acid formation. *A. tamarii* showed a productivity of 5 mg/l h from *p*-hydroxybenzoic acid, 2.5 times greater, compared with *P. variotii* of 2 mg/l h (Sachan *et al.*, 2006).

The same strain *A. tamarii* in liquid culture and culture medium B (low sugar concentrations) and *p*- coumaric acid, shows the capacity to generate caffeic acid as established in the pathway reference. This biotransformation reaction suggests the presence of 4-coumarate-3- hydroxylase enzyme in the microorganism. The productivity yielded with this strain was of 144 mg/ l d, 9 times greater than the one obtained with *P. cinnabarinus* of 16 mg/ l d (Estrada-Alvarado *et al.*, 2003).

In solid culture, *A. tamarii* V12307, biotransform *p*-coumaric acid with yields of 56% and 24%, with medium A and B. In medium A with different compounds, only one compound is produced. Products obtained by solid culture shall be identified lately.

*A. niger* C17309 in liquid culture biotransforms *p*-coumaric acid in intermediaries from hydroxybenzoate, generating compounds of high added value such as 4-hydroxybenzaldehyde, methyl-hydroxybenzoate, hydroquinone and 4-propylphenol in a proportion of 2.47%, 0.54%, 10.6%, 0.65%, respectively. The presence of these compounds suggests that reactions are given at the propenoic chain level and not in the aromatic ring.



Ferulic acid in liquid culture is biotransformed by *A. niger* C28B25 by the degradation pathway from the propenoic chain in vanillic acid. Furthermore, it was observed a productivity in terms of mg/ l d of 3 times greater with *A. niger* C28B25 than the one reported with *P. variotii* MTCC 6581 (Ghosh et al., 2006).

Ferulic acid biotransformation into 4–vinylguaiacol by *A. niger* DAR 2, is done mostly by non oxidative decarboxilation. When this compound was obtained in solid culture, productivity was two times, besides, the time was shorter, in a third part than in liquid culture. With the same system, wild strain *A. niger* C28B25 transform ferulic acid into caffeic acid while in liquid cultures this compound it was not found.

Ferulic acid biotransformation showed principally reactions in propenoic chain, with exception of wild strain C28B25 using solid culture, in this case, the reaction was demetylation of aromatic ring.

In this work, it was showed that high sugar concentrations could inhibit the products generation, and not only the easiest sugars assimilation as Ander et al., (1980), and Lesage Meesen et al., (1997) reported.

The biotransformation reactions studied in this work, could be applied in coffee pulp and in another byproducts with an interesting hydroxycinnamic acids level, in order to obtained natural antioxidants and flavours.

---

*CAPÍTULO 1*  
*INTRODUCCIÓN*

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de residuos agrícolas por diferentes industrias como la industria de los cereales, generan millones de toneladas de subproductos al año. En México, se generan alrededor de 4, 500 millones de toneladas provenientes del trigo, 25, 500 millones de toneladas de la industria del maíz (SAGARPA, 2000). La industria del café produjo en el año de 2008, alrededor de 707.35 millones de toneladas de pulpa de café seca (INEGI, 2009). Algunos de estos subproductos son utilizados como alimento para ganado, aunque en años recientes, diferentes investigadores han utilizado estos residuos para la obtención de productos de alto valor agregado.

En muchos subproductos agrícolas, se encuentran de manera abundante los ácidos hidroxicinámicos, los cuales se encuentran con frecuencia formando ésteres o éteres con polímeros de carbohidratos (Crozier *et al.*, 2006). La pulpa derivada de la industria del café, contiene alrededor de 3097 mg/kg de ácido clorogénico, 1985 mg/kg de ácido caféico, 113 mg/kg de ácido ferúlico y 81 mg/kg de ácido *p*-cumárico (Torres-Mancera, 2008), lo que hace que este subproducto sea interesante para ser considerado como materia prima para la obtención de precursores de aromas y antioxidantes que son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmetológica.

La biotransformación microbiana es una herramienta importante a través de la cual, se pueden obtener productos de alto valor agregado a partir de algunos subproductos agrícolas. Además, las biotransformaciones se consideran tecnologías limpias y los productos obtenidos por estas vías, se denominan “naturales” (Leresche and Meyer, 2006).

Existen reportes de la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos a bajas concentraciones, debido a su toxicidad, ya que se ha reportado que puede existir la formación de complejos con proteínas lo que lleva a una disminución de la actividad enzimática. Con iones metálicos, se ha observado la formación de complejos tóxicos (Scalbert, 1991).

La biotransformación del ácido ferúlico es la más estudiada (Falconnier *et al.*, 1994, Narbad and Gasson, 1998, Lomascolo *et al.*, 1999), para la obtención de vainillina, ácido vainillínico y otros compuestos similares.

La biotransformación del ácido *p*-cumárico, se ha realizado principalmente con *Pycnoporus cinnabarinus*, *Paecilomyces variotii*, *Halomonas*, *Hematococcus pluvialis*. Los reportes de la biotransformación del ácido clorogénico para la producción de ácido caféico y ácido quínico son escasos.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue biotransformar ácidos hidroxicinámicos presentes en un subproducto agrícola mexicano como lo es la pulpa de café. Para llevar a cabo este estudio, se usaron mohos de la colección de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAMI) y el Institut de Recherche pour le Développement (IRD). Estas cepas fueron aisladas de las zonas cafetaleras de Veracruz y Chiapas (Roussos *et al.*, 1989). Se seleccionaron principalmente cepas del género *Aspergillus* debido a su alta selectividad en la síntesis de biomoléculas (Ward *et al.*, 2006).

En este estudio se utilizaron los cultivos en medio líquido y sólido. Éste sistema simula las condiciones naturales del desarrollo de los hongos. Se ha reportado que la producción enzimática es mayor (Hölker y Lenz, 2005) y la presencia de barreras difusionales debido a la configuración de los soportes utilizados (Mitchel *et al.*, 2003). En el cultivo sólido el género *Aspergillus* ha sido ampliamente utilizado debido a los altos títulos enzimáticos obtenidos (Ward *et al.*, 2006) lo que puede ser extrapolado a la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos.

Para el desarrollo de este trabajo, se estableció una vía de biotransformación para los ácidos hidroxicinámicos (Figura 1.1), basada en la vía del ácido fenilpropenóico donde se sintetizan los ácidos hidroxicinámicos derivados de la fenilalanina y tirosina (Verpoorte, 2000).

En la Figura 1.1, se aprecian los diferentes intermediarios de la ruta de biotransformación, que comienza con el ácido clorogénico, seguido del ácido *p*-

cumárico, el ácido caféico, el ácido vainillínico, para llegar al final hasta vainillina.

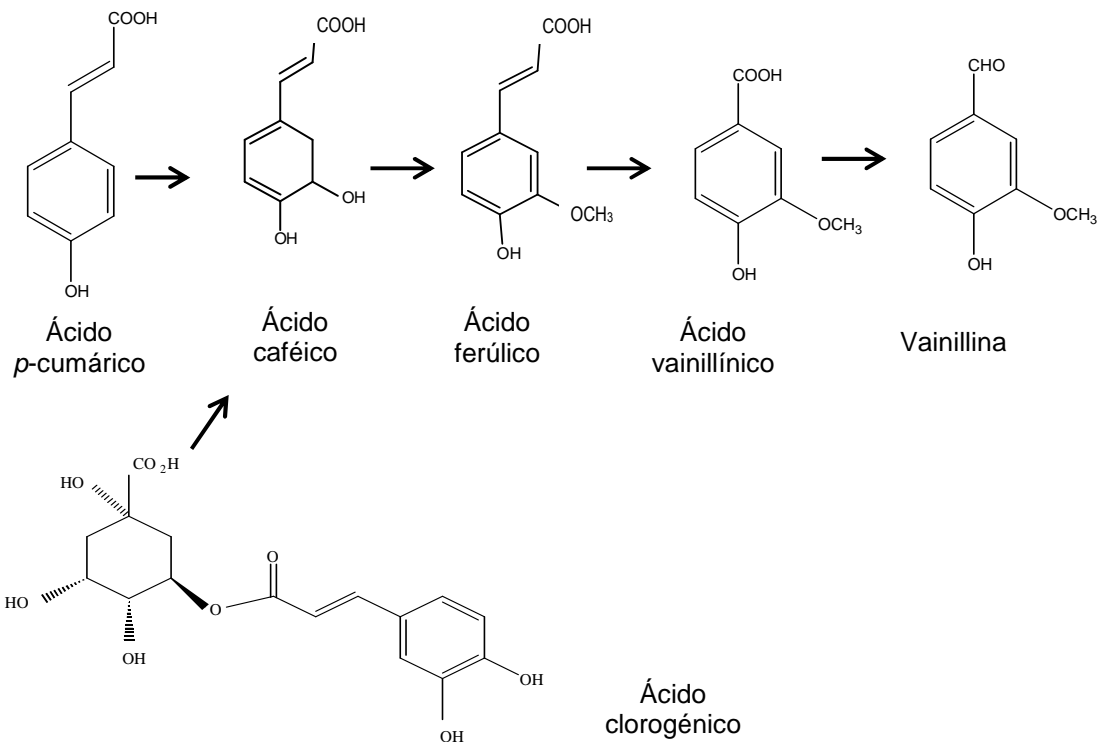


Figura 1.1. Vía de referencia para la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos por los hongos filamentosos.

Este trabajo se encuentra organizado de la siguiente manera, en una primera etapa, se describen los antecedentes relacionados con este trabajo. Posteriormente se realiza la exposición de motivos, la hipótesis que éstos generan, así como los objetivos planteados para el desarrollo de este estudio. A continuación, se describen los materiales y métodos con la posterior sección de resultados, que se divide en la selección de cepas fúngicas y la biotransformación en cultivo líquido y sólido empleando las cepas seleccionadas. Finalmente, se presentan las conclusiones y perspectivas derivadas de este estudio.

---

*CAPÍTULO 2*  
*ANTECEDENTES*

## **2. ANTECEDENTES.**

Los metabolitos primarios son compuestos que tienen un rol esencial asociados con la fotosíntesis, respiración, crecimiento y desarrollo. En este grupo se encuentran los fitosteroles, nucleótidos, aminoácidos, acil-lípidos y ácidos orgánicos. Otros compuestos que pueden acumularse en concentraciones considerables en algunas especies, se les conoce como metabolitos secundarios y juegan un rol importante en las plantas, sirven de protección contra infecciones microbianas, atraen los polinizadores y protegen de los rayos UV. Estos compuestos tienen interés comercial, ya que han sido usados en pegamentos, aceites, saborizantes, medicamentos, perfumes, y son fuentes de medicamentos naturales, antibióticos, insecticidas y herbicidas (Crozier *et al.*, 2006).

Basado en su origen biosintético los metabolitos secundarios de las plantas se dividen en 3 principales grupos: i) flavonoides y compuestos fenólicos, ii) terpenoides y iii) alcaloides que contienen sulfuro y nitrógeno (Crozier *et al.*, 2006). La biosíntesis de los compuestos fenólicos está constituido por complejas rutas metabólicas basadas principalmente en las vías del ácido shikímico, fenilpropenóico y flavonoides (Crozier *et al.*, 2006).

En este capítulo se definen los metabolitos primarios y secundarios, sus roles e importancia, seguida de la descripción de un grupo de compuestos fenólicos, en particular, los ácidos hidroxicinámicos y los antioxidantes. Posteriormente se hace una comparación entre la fermentación en medio sólido y sumergido, y una revisión acerca de la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos. Al final de este capítulo se describen los antecedentes directos de nuestro grupo de investigación sobre este tema.

### **2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS.**

El término “compuesto fenólico” describe cientos de moléculas encontradas en plantas; son compuestos que poseen en su estructura un anillo bencénico sustituido por al menos un grupo hidroxilo (Figura 2.1) (Rodríguez *et al.*, 2009).

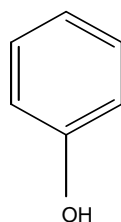


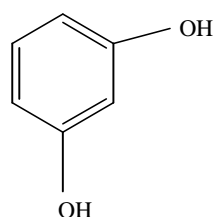
Figura 2.1. Anillo fenólico

En los últimos años investigadores y productores de alimentos han incrementado su interés en los compuestos fenólicos, debido a sus propiedades antioxidantes, a su gran abundancia en la dieta y su probable rol en la prevención de varias enfermedades asociadas a procesos oxidativos como el cáncer y las enfermedades cardiovasculares (Rodríguez *et al* 2009).

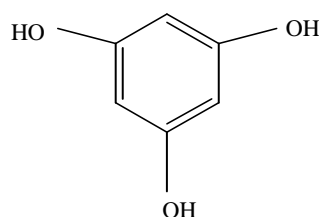
Los compuestos fenólicos cubren una amplia variedad de compuestos químicos, estos compuestos se pueden clasificar de diversas formas, una de ellas se basa en el número de carbonos de la molécula; la clasificación se resume en la Tabla 2.1 (Crozier *et al.*, 2006).

### 2.1.1 FENOLES SIMPLES

Son compuestos que pueden tener de uno a tres sustituyentes hidroxilo en el anillo aromático, en este grupo se encuentran el resorcinol y floroglucinol (Figura 2.2) (Vermerris y Nicholson, 2006).



Resorcinol



Floroglucinol

Figura 2.2. Fenoles simples



Tabla 2.1. Clasificación de compuestos fenólicos (Crozier *et al.*, 2006)

Estructura	Clase
$C_6$	Fenoles simples
$C_6-C_1$	Ácidos fenólicos y compuestos afines
$C_6-C_2$	Acetofenonas y ácidos fenil acéticos
$C_6-C_3$	Ácidos cinámicos y compuestos afines
$C_6-C_3$	Cumarinas y afines
$C_6-C_3-C_6$	Chalconas, auronas y dihidrochalconas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides y afines
$C_6-C_3-C_6$	Antocianidinas y compuestos afines
$C_{30}$	Biflavoniles
$C_6-C_1-C_6-C_6-C_2-C_6$	Biflavoniles, Benzofenonas, xantonas y stilbenos
$C_6-C_{10}-C_{14}$	Quinonas
$C_{18}$	Betacianinas
Lignanós, neolignanós	dímeros u oligómeros
Ligninas	Polímeros
Taninos	oligómeros o polímeros
Flobafenos	Polímeros

### 2.1.2 ACIDOS FENÓLICOS Y ALDEHÍDOS

Los ácidos fenólicos son también conocidos como hidroxibenzoicos, el principal componente es el ácido gálico, pero también encontramos el ácido *p*-hidroxibenzoico, el ácido gálico, el ácido protocatecólico, el ácido vainillínico (Figura 2.3). Los aldehídos son compuestos relacionados, ya que en lugar de poseer el grupo carboxilo, presentan el grupo aldehído, en este grupo se encuentra la vainillina (Crozier *et al.*, 2006).

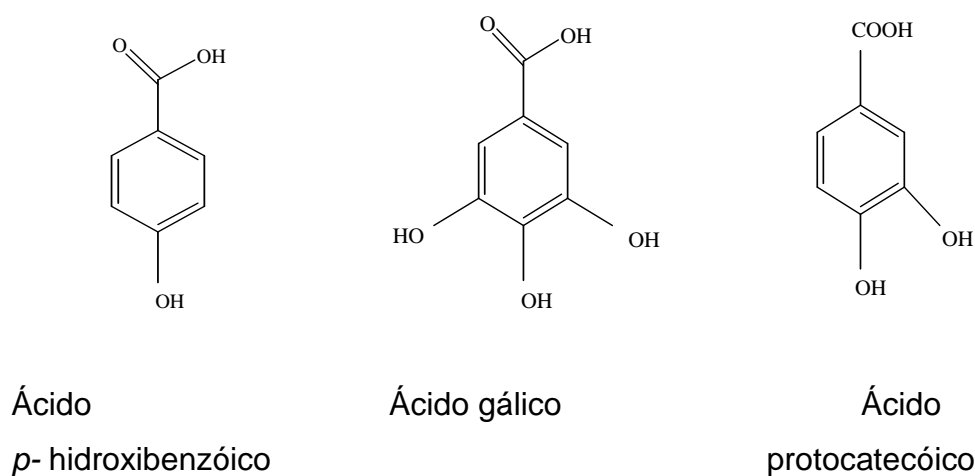
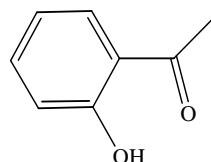


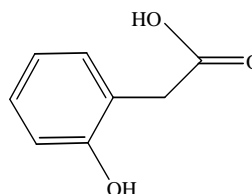
Figura 2.3. Estructuras de ácidos fenólicos

### 2.1.3 ACETOFENONAS Y ACIDOS FENILACÉTICOS

Las fenonas son compuestos  $C_6-C_2$ , se encuentran raramente en la naturaleza. En este grupo se encuentran la 2-hidroxiacetofenona y el ácido 2-hidroxifenilacético (Figura 2.4) (Vermerris y Nicholson, 2006).



2-hidroxiacetofenona



ácido 2-hidroxifenilacético

Figura 2.4. Acetofenonas y ácido fenilacético

### 2.1.4 CUMARINAS

Son compuestos fenólicos que presentan la estructura  $C_6-C_3$ . Muchos de estos compuestos se encuentran naturalmente como lactonas, ya que están oxigenadas en la posición  $C_7$ . En este grupo se encuentra la umbeliferona (Figura 2.5) (Bhat *et al.*, 2005), obtenida a partir de la cumarina por sustitución de su átomo de hidrógeno en posición 7 por un grupo hidroxilo.

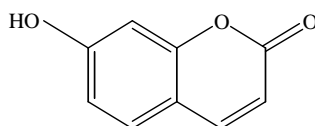


Figura 2.5 Estructura de un derivado de la cumarina: la umbeliferona

### 2.1.5 FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos con 15 átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ). Es la familia más numerosa de los compuestos fenólicos y se distribuyen ampliamente en todo el reino vegetal. Están presentes en altas concentraciones en la epidermis, hojas y piel de frutas y juegan un rol muy importante como metabolitos secundarios (Crozier *et al.*, 2006). Las principales subclases de flavonoides son los flavones, los flavonoles, los flavan-3-oles, los isoflavones, los flavonones y las antocianidinas. Otro grupo de flavonoides que

cuantitativamente son menores en la dieta son los dihidroflavonoles, los flavan-3,4-dioles, las cumarinas, las chalconas, las dihidrochalconas y las auronas (Crozier *et al.*, 2006). En la Figura 2.6, se muestra la molécula de la naringerina, un flavonoide que se encuentra en los cítricos.

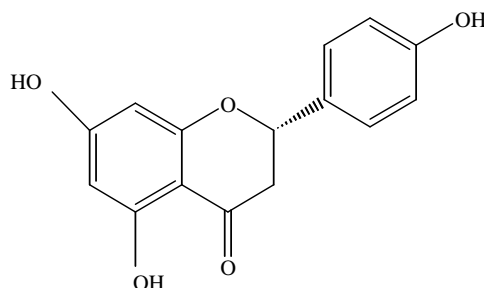


Figura 2.6 Estructura de un flavonoide: la naringerina

### 2.1.6 BIFLAVONILES

Estos compuestos presentan un esqueleto  $C_{30}$ , son dímeros de flavones y se encuentran principalmente en gimnospermas. El más conocido es la ginkgetina (Figura 2,7), que se encuentra en el *Ginkgo biloba* (Vermerris y Nicholson, 2006).

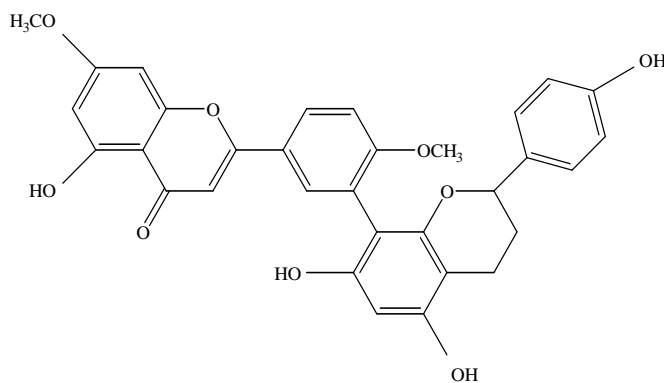


Figura 2. 7 Estructura de un biflavonil: la ginkgetina.

### 2.1.7 BENZOFENONAS, XANTONAS Y ESTILBENOS

Las benzofenonas y xantonas presentan un esqueleto  $C_6-C_1-C_6$  (Vermerris y Nicholson, 2006). Los estilbenos son compuestos con una estructura  $C_6-C_2-C_6$ , se producen en las plantas como respuesta a los ataques fúngicos, bacterianos

ó virales. Estos compuestos se encuentran en abundancia en uvas (resveratrol, ya que se han encontrado en vinos alrededor de 3 mg/l, mientras que en la, soya y cacahuate los reportes no son definitivos (Figura 2.8) (Crozier *et al.*, 2006).

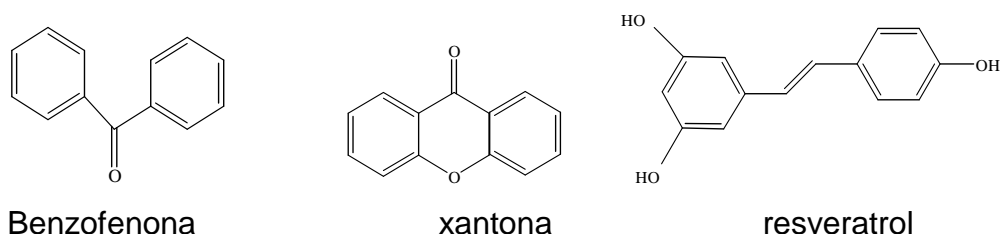


Figura 2.8. Estructura de la benzofenona, la xantona y resveratrol

### 2.1.8 BENZOQUINONAS, ANTRAQUINONAS Y NAFTAQUINONAS

La quinona es un constituyente de moléculas de importancia biológica, como la vitamina K que es una 2-metil-naftoquinona. La coenzima Q es una ubiquinona. Desempeña un papel importante como aceptor en cadenas de transporte de electrones como las de los fotosistemas I y II de la fotosíntesis y la respiración aeróbica (Figura 2.9) (Vermerris y Nicholson, 2006).

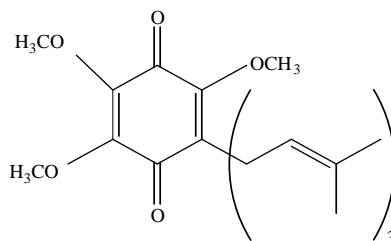


Figura 2.9. Estructura de una ubiquinona: la Coenzima Q

### 2.1.9 BETACIANINAS

Las betacianinas son pigmentos rojos que se encuentran en la remolacha. Se encuentran generalmente como glucósidos y presentan nitrógeno en su estructura (Figura 2.10) (Vermerris y Nicholson, 2006).

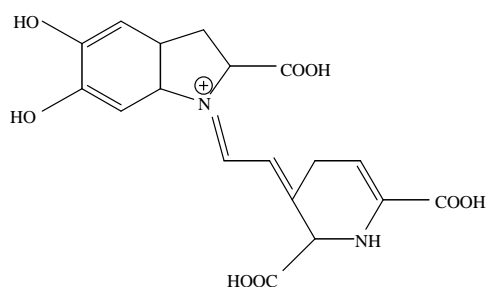


Figura 2.10. Estructura de una betacianina: la betanidina

### 2.1.10 LIGNANOS

Son dímeros u oligómeros que resultan de acoplar los monolignoles, alcohol coniferílico, alcohol cumaroílico y alcohol sinapílico (Figura 2.11). El alcohol coniferílico es el monolignol usado para la síntesis del lignano que se encuentra en gimnospermas y angiospermas (Vermerris y Nicholson, 2006).

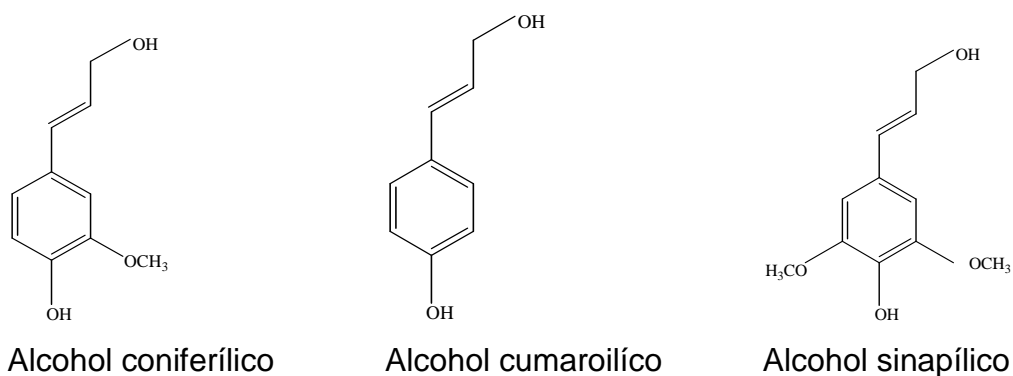


Figura 2.11. Estructuras de lignanos

### 2.1.11 TANINOS

Los taninos son un grupo de compuestos polifenólicos que poseen la capacidad de precipitar proteínas. Estos se clasifican en taninos hidrolizables, taninos condensados y pseudotaninos; se encuentran en diversas especies de plantas, se encuentran en las hojas, flores, tallos y en frutos (Bhat *et al.*, 2005).

En la medicina natural china y japonesa, los taninos han sido utilizados como compuestos antiinflamatorios y antisépticos, en el tratamiento de diversas

enfermedades que incluyen diarreas y tumores en estómago y duodeno (Vermeris y Nicholson, 2006).

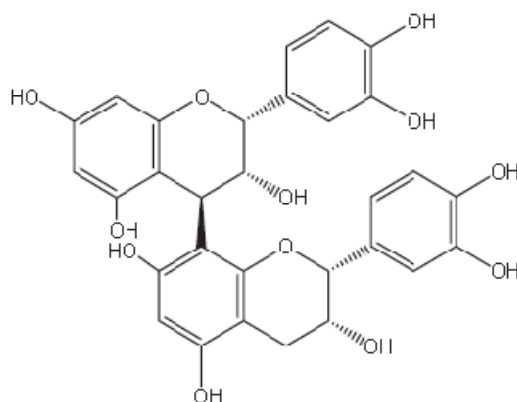


Figura 2.12. Estructura de un tanino: la procianidina B2

### 2.1.12 FLOBAFENOS

La estructura de los flobafenos aún no ha sido elucidada del todo, se cree que son polímeros de los flavan-4-oles, en este grupo se encuentra el apiferol y el luteoferol (Figura 2.13). Se ha observado que la acumulación de los flobafenos producen coloraciones rojas (Vermeris y Nicholson, 2006).

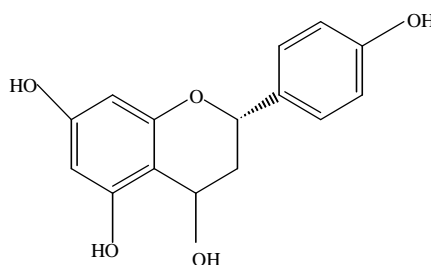


Figura 2.13 Estructura de un flobafeno: el apiferol

## 2.2 ACIDOS HIDROXICINÁMICOS

Los ácidos cinámicos son ácidos trans-fenil-3-propenóico y difieren en la sustitución del anillo. Su estructura es del tipo  $C_6-C_3$ , que posteriormente se convierten en un gran número de hidroxicinamátos, derivados de la vía del ácido fenilpropenóico. Los hidroxicinamátos más comunes son el *p*-cumárico, el caféico y el ferúlico (Figura 2.14), los cuales se acumulan en sus respectivos

ésteres como cutárico, caftárico y fertárico. Los conjugados del ácido quínico y caféico, tales como 3-4- y el ácido 5-o-cafeoilquínico son compuestos que se encuentran en frutas y vegetales. El ácido 5-o-cafeoilquínico, frecuentemente conocido también como clorogénico se encuentra distribuido en las hojas de mate y en granos de café (Crozier *et al.*, 2006).

Los hidroxicinamátos son los compuestos centrales en la biosíntesis de los polifenoles. La vía del ácido shikímico parte de la fenilalanina, la cual ingresa a la vía del ácido propenóico y es convertida en ácido trans cinámico por una enzima amonio liasa, seguido de la hidroxilación de la posición 4 del anillo aromático, lo que da lugar al ácido 4-hidroxicinámico o *p*-cumárico. Una posterior hidroxilación de la posición 3 del anillo aromático forma el ácido caféico y la subsecuente *o*-metilación permite la formación del ácido ferúlico (Rechner *et al.*, 2001).

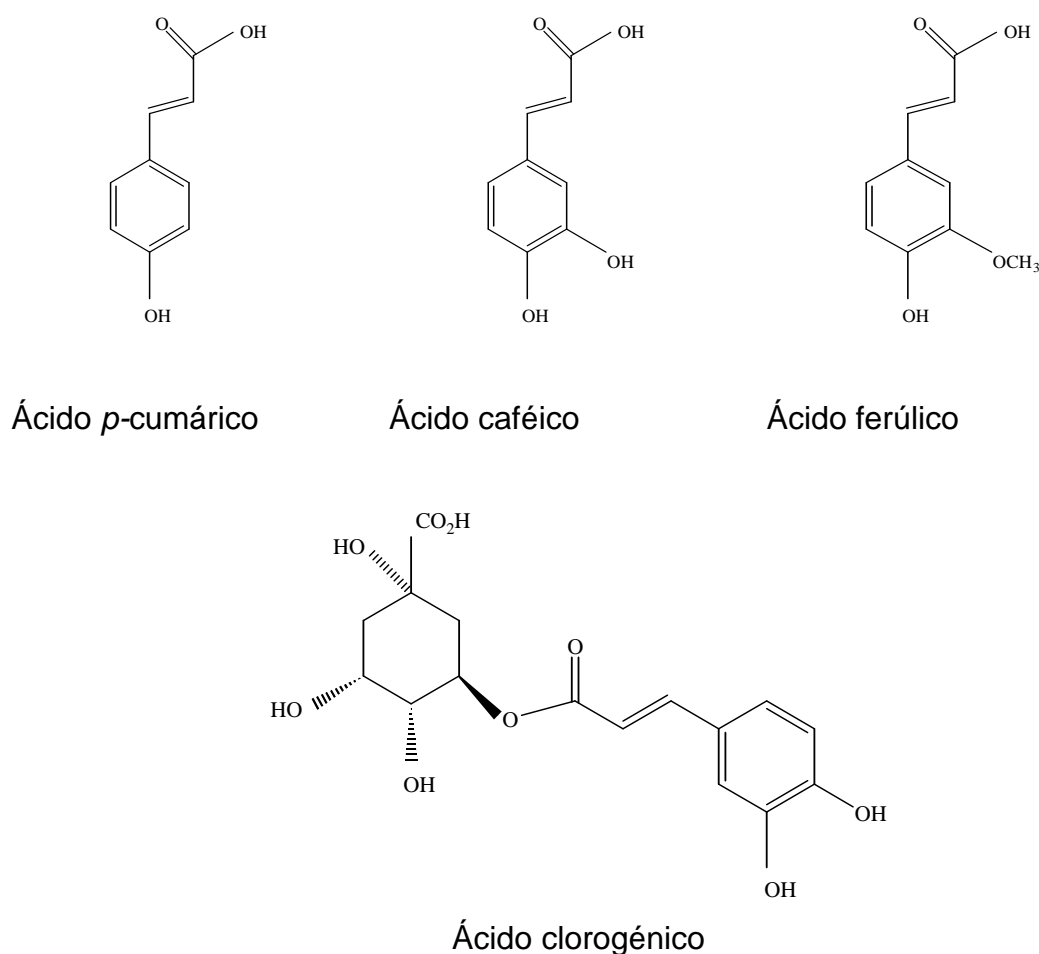


Figura 2.14. Ácidos hidroxicinámicos

Dependiendo de la posición y número de los residuos acil, estos ácidos se dividen en los siguientes grupos: monoésteres del ácido caféico, *p*-cumárico y ácido ferúlico; di-, tri- y tetra ésteres del ácido caféico, arreglos de di-ésteres de ácido caféico y ferúlico o caféico y sinápico; arreglos de ésteres del ácido caféico con ácido alifáticos, ejemplo succínico y oxálico (Pieta *et al.*, 2003).

Los ácidos cinámicos se pueden condensar con otras moléculas, incluyendo el ácido rosmarínico, málico, tartárico, aminoácidos aromáticos, colina, mono y polisacáridos, glicerol, mio-inositol y diferentes glucósidos para formar antocianinas, flavonoles, y diterpenos, (Pieta *et al.*, 2003). No hay duda alguna que el cinamato más abundante en la naturaleza es el ácido caféico, el ácido cafeoilquínico y dicafeoilquínico. Usualmente son los isómeros 5 los que predominan, pero en algunas frutas y brassicas (género de plantas brassicaceae, entre las cuales se encuentran la col, coles de Bruselas, coliflor, brócoli), el isómero 3 es el que predomina (Pieta *et al.*, 2003).

El café en tan sólo 200 ml (2% peso/volumen), contiene alrededor de 50-150 mg de ácido clorogénico. Los arándanos, berenjenas, manzanas, mate y la sidra son fuente de cinamatos. Los vinos pueden tener una importante contribución por los conjugados del ácido tartárico, en tanto que las uvas y el jugo de uva por los conjugados de ácido caftárico. La lechuga es la principal fuente de ácido chicórico (dicafeoil tartárico) y ácido cafeoil málico (alrededor de 3mg/100g), aunque las endivias duplican esta concentración. La espinaca es la hoja que posee la mayor cantidad de ácido *p*-cumárico conjugado 30-35 mg/100 g, mientras que el tomate contiene alrededor de 3mg/100g (Pieta *et al.*, 2003).

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran de manera abundante como constituyentes de la pared celular de las plantas. El ácido ferúlico es de los compuestos fenólicos más abundantes en plantas, por ejemplo el salvado de trigo contiene 5 g/kg; la pulpa de remolacha azucarera 9 g/kg y 50 g/kg en grano de maíz (Ou, 2004).

Estos ácidos, particularmente el ácido ferúlico y *p*-cumárico, se encuentran unidos de manera covalente a polisacáridos por enlaces éster o éter como componente de la lignina. Se sabe que una proporción considerable del ácido



*p*-cumárico se encuentra esterificado a la lignina, mientras que el ácido ferúlico forma uniones éter (Estrada Alvarado *et al.*, 2001).

El ácido ferúlico raramente se encuentra en las plantas en forma libre, este se encuentra principalmente unido con carbohidratos como conjugados glicosídicos, principalmente con ésteres y amidas en una amplia variedad de productos naturales. Como ésteres el ácido ferúlico se encuentra unido a polisacáridos, flavonoides y a ácidos hidrocarboxílicos, incluyendo ácido málico, tartárico, tartrónico, hidroxicitrico, quínico, glucónico y ácido grasos. También puede presentarse esterificado con la glucósido tetrahidroisoquinolina, un glucósido cianogénico y con la aminociclopentanona.

Las amidas del ácido ferúlico como putrecina, tiramina o triptamina pueden ser indicadores de estrés ambiental en plantas. Amidas del ácido ferúlico con aminoácidos o dipéptidos se han utilizado como conservadores en panadería. El ácido ferúlico se encuentra presente en frutas, vegetales, granos, semillas, hojas, nueces flores y otros tipos de vegetación (Rosazza *et al.*, 1995).

El ácido *p*-cumárico es clasificado como un compuesto polifenólico que se encuentra presente en las aguas residuales de la elaboración del aceite de oliva y el destilado de vinos, creando serios problemas de contaminación en el mar mediterráneo. Considerando la abundancia de estos compuestos es posible utilizarlos como sustratos para la producción de antioxidantes y precursores de aromas denominados “naturales” (Estrada-Alvarado *et al.*, 2001).

### **2.3 ANTIOXIDANTES Y AROMAS**

Los antioxidantes son sustancias que en pequeñas concentraciones son capaces de prevenir o retardar la oxidación de materiales o sustancias fácilmente oxidables tales como las grasas. Existen distintos tipos de antioxidantes y, de acuerdo a su origen, pueden clasificarse como naturales o sintéticos. Los antioxidantes sintéticos fueron desarrollados a partir de la necesidad de obtener una protección más efectiva y, al mismo tiempo, más económica en relación a los antioxidantes naturales (Miquel *et al.*, 2004).

Tradicionalmente los compuestos fenólicos han sido considerados nutricionalmente inapropiados porque precipitan proteínas, inhiben enzimas digestivas, modifican la absorción de vitaminas y minerales, reduciendo así el valor nutricional de los alimentos. Recientemente se han reevaluado sus propiedades atribuyéndoles una disminución de los efectos adversos a la salud. La presencia de compuestos fenólicos en la dieta resulta benéfica por la acción preventiva contra la carcinogénesis y la mutagénesis. El efecto de los compuestos fenólicos depende de la cantidad consumida y su biodisponibilidad (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los compuestos fenólicos influyen en las propiedades sensoriales de los alimentos, como aroma, sabor, astringencia y color. La contribución de los compuestos fenólicos en los aromas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos volátiles, los cuales se producen por la hidrólisis de alcoholes superiores o por el metabolismo de diferentes microorganismos, bacterias, hongos y levaduras (Rodríguez *et al.*, 2009).

Los ácidos hidroxicinámicos y sus conjugados pueden actuar como potentes antioxidantes. En las plantas comestibles fungen como agentes protectores del deterioro oxidativo. Estudios del mecanismo antioxidante a nivel molecular del ácido ferúlico y sus productos de acoplamiento con el linoleáto, han demostrado que se presenta una reacción de captación de radicales en la posición 3 del radical ferulato con cuatro tipos de radicales peróxido del etil-linoleáto. Los peróxidos producidos son sometidos posteriormente a un reordenamiento intramolecular para formar peróxidos tricíclicos estables (Masuda *et al.*, 2006).

Wang *et al.*, en el año de 1993 demostraron a través de estudios de radiólisis sobre el radical hidroxilo del ácido caféico, que este compuesto tiene un buen potencial antioxidante, incluso mejor que el BHT (butilhidroxitolueno) y el BHA (hidroxibutianisol), por lo que puede inhibir el daño por radiación y usarse como conservador alimentario.

El poder antioxidante del ácido ferúlico y caféico aplicado tópicamente ha sido demostrado por Saija *et al.*, en 1999, al evaluar la actividad antioxidante de

estos compuestos fenólicos en dos modelos experimentales, uno de ellos aplicando luz UV sobre la fosfatidilcolina de las membranas liposomales y el otro fue la capacidad de reaccionar con el óxido nítrico (uno de los radicales que participan en las reacciones de oxidación). En este estudio el ácido ferúlico y caféico demostraron una eficiente protección de la fosfatidilcolina de los liposomas por la radiación inducida, además también se demostró que son capaces de reaccionar con el óxido nítrico.

El aroma es atribuible a la combinación de numerosos compuestos volátiles cada uno de los cuales presenta un olor diferente. La diferencia en las características de ciertos aromas es debida en gran parte, a las distintas proporciones de ésteres, ácidos, alcoholes, aldehídos y cetonas. Muchas sustancias aromáticas, especialmente las de frutas y hortalizas son productos o subproductos de diversas rutas metabólicas (Wong, 1995).

El sabor ácido del café se debe a la presencia de ácidos orgánicos entre los cuales se encuentran los ácidos ferúlico, caféico y clorogénico, los cuales alcanzan un contenido del 7.5% en los granos del café (Wong, 1995).

Los extractos de vainilla contienen entre otros compuestos el *p*-hidroxibenzaldehído, el cual es la segunda molécula más importante en cuanto a concentración, después de la vainillina, ambos contribuyen al aroma natural de la vainilla (Estrada- Alvarado *et al*, 2001).

#### **2.4 COMPARACIÓN ENTRE FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO Y FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO**

Los procesos fermentativos se dividen en fermentación en medio sólido (FMS) y fermentación en medio líquido (FML) (Figura 2.15.). Del lado izquierdo el diseño del bioreactor de Durand y Chereau en FMS y del lado derecho un bioreactor agitado en FML. Para cada bioreactor se muestra una vista a escala con el fin de destacar las diferencias de microestructura en los dos sistemas. La principal diferencia es la cantidad de agua en el proceso (Mitchel *et al.*, 2000).

En la fermentación en medio sólido el agua libre es mínima y el sustrato posee nutrientes necesarios para permitir el crecimiento de microorganismos (Pandey, 2003). Los nutrientes se encuentran en la matriz sólida; el contenido de humedad varía del 12% hasta un máximo de 80%. Por debajo del 12% no se presenta ninguna actividad biológica. En contraste, en la fermentación líquida el medio de cultivo contiene alrededor de 50 g/l de los solutos y el contenido de agua es de alrededor del 95% (Mitchel *et al.*, 2000).

Las principales diferencias de ambos sistemas se muestran en la Tabla 2.2, y ponen de manifiesto que el tipo de cultivo para cada sistema debe ser elegido de acuerdo a sus características particulares. Los estudios de la producción de enzimas por FMS en comparación con la FML, han mostrado múltiples ventajas entre las que se encuentran la obtención de mayores rendimientos, disminución de los tiempos de fermentación y menor degradación de las enzimas de interés debido a proteasas (Hölker y Lenz, 2005).

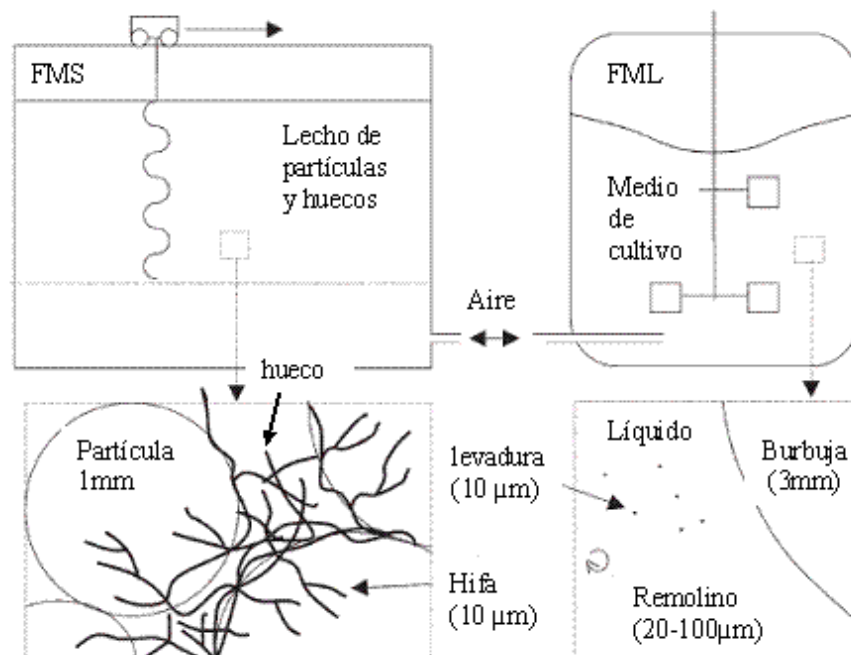


Figura 2.15. Comparación entre los sistemas de fermentación en medio líquido y sólido. Tomado de Mitchel *et al.*, 2000.

Tabla 2.2. Comparación entre FMS y FML.

Fermentación en medio sólido FMS	Fermentación en medio líquido FML
Algunos compuestos solo se producen en condiciones de baja humedad.	Muchos productos se producen mejor por FML.
El medio es relativamente simple, éste contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento microbiano.	El medio contiene muchos ingredientes procesados y caros. Con medios definidos se obtiene buena reproducibilidad.
La baja actividad de agua ayuda a inhibir el crecimiento de contaminantes.	La actividad de agua es alta, por lo que las contaminaciones son frecuentes.
Los medios son concentrados por lo que se pueden usar pequeños bioreactores, se obtienen altas productividades.	Los medios son diluidos, ocupan grandes volúmenes, se obtienen bajas productividades.
La alta concentración de sustratos permite obtener altas concentraciones de sustrato.	La alta concentración de sustratos puede producir problemas reológicos.
La capacidad de remover el calor metabólico es restringida, originando problemas de sobrecalentamiento.	El alto contenido de agua permite un mejor control de la temperatura.
El control del proceso puede presentar dificultades para obtener mediciones en línea y medición de biomasa.	Existe gran disponibilidad de sensores. Se pueden adicionar sustancias para el control del proceso.
No se producen grandes volúmenes de aguas residuales.	Se producen grandes volúmenes de aguas residuales.

La FMS ofrece una alternativa en la producción de metabolitos secundarios. Su producción se encuentra asociada con la formación de hifas aéreas en la fase estacionaria de crecimiento. La FMS es una alternativa para explorar la producción de nuevos metabolitos y metabolitos secundarios por cepas fúngicas (Hölker y Lenz, 2005).

## 2.5 BIOTRANSFORMACION DE LOS ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS

El catabolismo de los hidroxicinamátos está asociado a la biodegradación de residuos vegetales. La biodegradación de los hidroxicinamátos como el ácido caféico, ferúlico y ácido *p*-cumárico ha sido estudiada en los últimos años. Diversos microorganismos, hongos, bacterias y levaduras son capaces de degradarlos (Sachan *et al.*, 2006).

Es importante mencionar que en este tipo de biotransformaciones, los ácidos hidroxicinámicos se usan en bajas concentraciones, debido a la toxicidad, ya que se ha reportado que puede existir la formación de complejos con proteínas, lo que lleva a una disminución de la actividad enzimática (Scalbert, 1991).

Una biotransformación es la conversión química de una sustancia definida en un producto deseado con la ayuda de células vivas que contienen las enzimas necesarias (Leresche y Meyer, 2006).

### 2.5.1 BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO

Las principales vías para la biotransformación del ácido ferúlico son seis:

- 1) La descarboxilación no oxidativa
- 2) La reducción del ácido ferúlico
- 3) La deacetilación dependiente de CoA vía  $\beta$ -oxidativa
- 4) La deacetilación dependiente de CoA vía no  $\beta$ -oxidativa
- 5) La desmetilación
- 6) El acoplamiento oxidativo

En la descarboxilación no oxidativa (Figura 2.16), el ácido ferúlico es convertido en 4-vinilguayacol; este mecanismo ha sido reportado en diferentes cultivos de microorganismos tales como levaduras (Mathew y Abraham, 2006; Suezawa y Susuki 2007), bacterias (Cavin *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Karmakar *et al.*, 2000) y hongos (Nazareth y Mavinkurve, 1986; Rahouti *et al.*, 1989).

La biotransformación del ácido ferúlico involucra también su reducción (Figura 2.17), para formar el ácido dihidroferúlico que posteriormente es reducido a vainillina que a su vez es oxidada para formar el ácido vainillínico que sufre una

desmetilación originando el ácido protocatecórico, este mecanismo ha sido demostrado en *Wolinella succinogenes* (Ohmiya *et al.*, 1986).

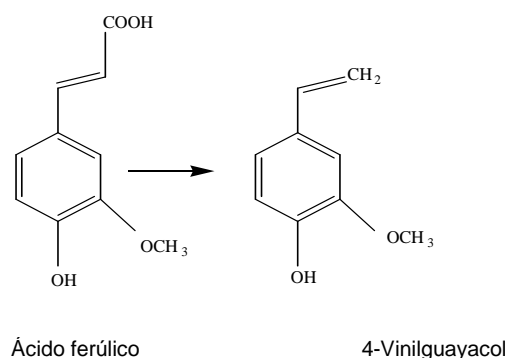


Figura 2.16. Descarboxilación no oxidativa del ácido ferúlico

Algunas reacciones adicionales a la reducción del ácido ferúlico incluyen la deshidroxilación, la desmetilación de la cadena lateral y la posterior degradación del anillo (Rosazza *et al.*, 1995).

La eliminación de una molécula de acetato de la cadena insaturada del ácido ferúlico es una reacción común, en bacterias y hongos. En esta vía metabólica se ha propuesto que la eliminación de la molécula de acetato incluye la adición de una molécula de agua a la doble ligadura lo que origina el derivado hidroxilado que posteriormente es oxidado a cetona y removido como molécula de acetato que origina vainillina. Se han reportado dos tipos de deacetilación, la dependiente de CoA y la independiente de CoA.

La deacetilación independiente de CoA para generar vainillina por la eliminación de una molécula de acetato ha sido reportada en *Pseudomonas mira*, *Streptomyces setonii* y *Fusarium solani* (Mathew and Abraham, 2006).

La deacetilación dependiente de CoA no  $\beta$ -oxidativa (Figura 2.18), ha sido observada en *P. fluorescens* AN 103 (Narbad and Gasson 1998), *Pseudomonas* sp. HR 199 (Overhage *et al.*, 1999) y *Amycolatopsis* sp. HR 167 (Achterholt *et al.*, 2000).

La desmetilación del ácido ferúlico (Figura 2.19), ha sido reportada en *Clostridium methoxybenzovorans* y *Enterobacter cloacae*; para la biotransformación del ácido ferúlico en ácido caféico. Estos microorganismos

presentaron diferentes vías para la o-desmetilación del ferúlico. El ácido caféico aparece como producto final o intermediario (Mathew y Abraham, 2006).

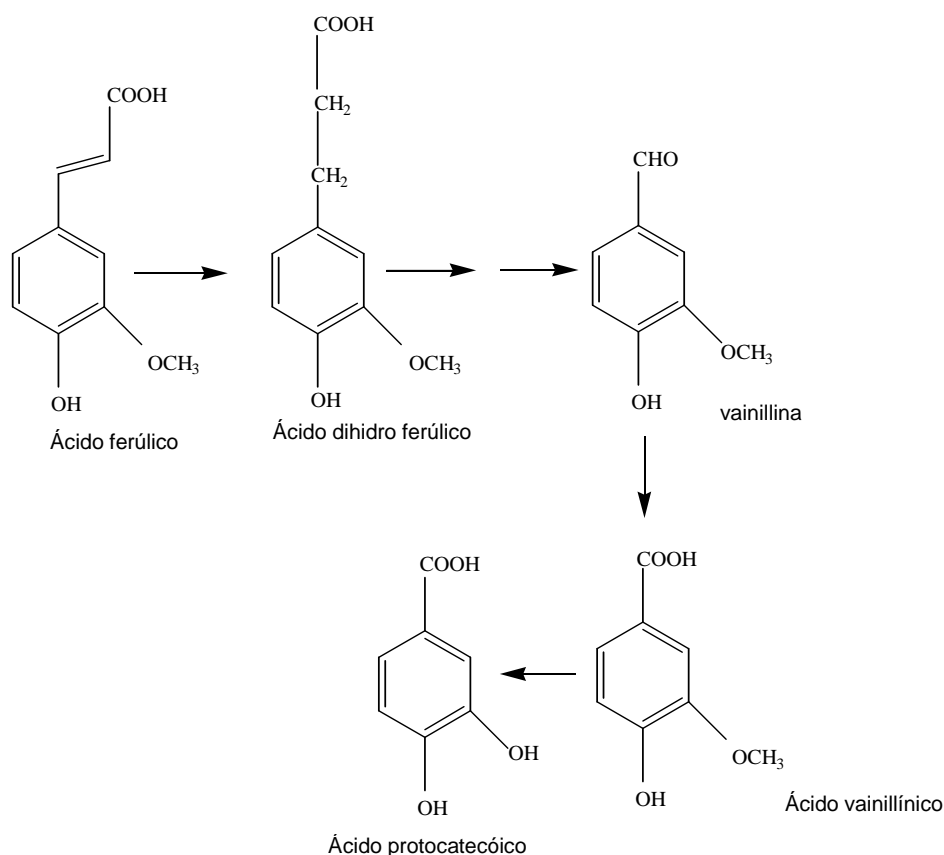


Figura 2.17. Reducción del ácido ferúlico

La generación de radicales fenol permite formar una gran variedad de dímeros, oligómeros y polímeros. El anillo aromático, los dobles enlaces conjugados y la cadena propenónica presentan sitios donde los electrones pueden ser generados por vía enzimática o química para deslocalizarse. Un ejemplo es el caso de la lacasa de *Marasmius quercophilus* (un basidiomiceto), donde se reporta la formación de varios compuestos polimerizados a partir del ácido ferúlico a través de reacciones mediadas por radicales (Mathew and Abraham, 2006).

La reacción de la peroxidasa sobre el ácido ferúlico realiza la esterificación de los principales polímeros en las paredes celulares de las plantas para formar diversos dehidrómeros del ácido ferúlico (Ralph *et al.*, 1994), los cuales hasta



ahora no han sido identificados y cuantificados en las paredes celulares (Micard *et al.*, 1997; Waldron *et al.*, 1997).

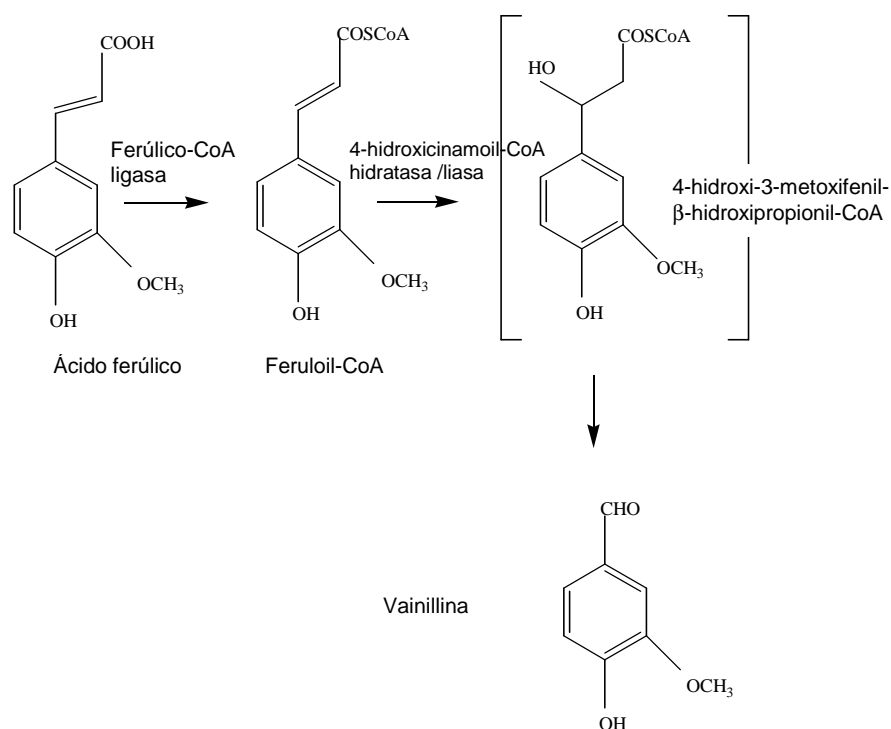


Figura 2.18. Deacetilación dependiente de CoA vía no  $\beta$ -oxidativa.

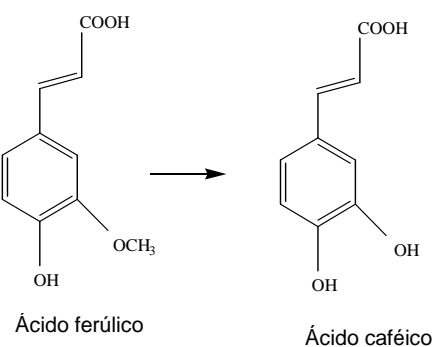


Figura 2.19. Desmetilación del ácido ferúlico

Con la peroxidasa de rábano, en medio ligeramente básico (pH=8), se obtuvieron diversos polímeros del ácido ferúlico o por vía química con cloruro de oxalyl o cloruro de tionilo. Aunque las estructuras de los polímeros no han sido completamente definidas, estos polímeros sintéticos han mostrado actividades anti-tumor y anti-VIH (Rosazza *et al.*, 1995).

### 2.5.2 BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO *p*-cumárico

La biotransformación del ácido *p*-cumárico se ha estudiado para producir hidroxibenzoatos por diversos microorganismos, compuestos que forman parte de sabores y aromas fenólicos. Los hidroxibenzoatos poseen actividades antioxidantes, antimicrobianas e hipoglucémicas (Sachan *et al.*, 2006). El ácido *p*-hidroxibenzoico un hidroxibenzoato, es usado como conservador en la industria cosmética, alimentaria y como monómero de polímeros del cristal líquido en dispositivos electrónicos (Sachan *et al.*, 2006).

La producción de vinilfenol a partir del ácido *p*-cumárico (Torres y Torres y Rosazza, 2001; Edlin *et al.*, 1998) se ha reportado en café, bebidas y vinos. Existen reportes de la biotransformación del ácido *p*-cumárico por diversos microorganismos, bacterias (Cavin *et al.*, 1997; Abdelkafi *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2003); hongos (Estrada-Alvarado *et al.*, 2001; Estrada-Alvarado *et al.*, 2003; Sachan *et al.*, 2006) e incluso algas (Tripathi *et al.*, 2002); las principales vías se muestran en la Figura 2.20.

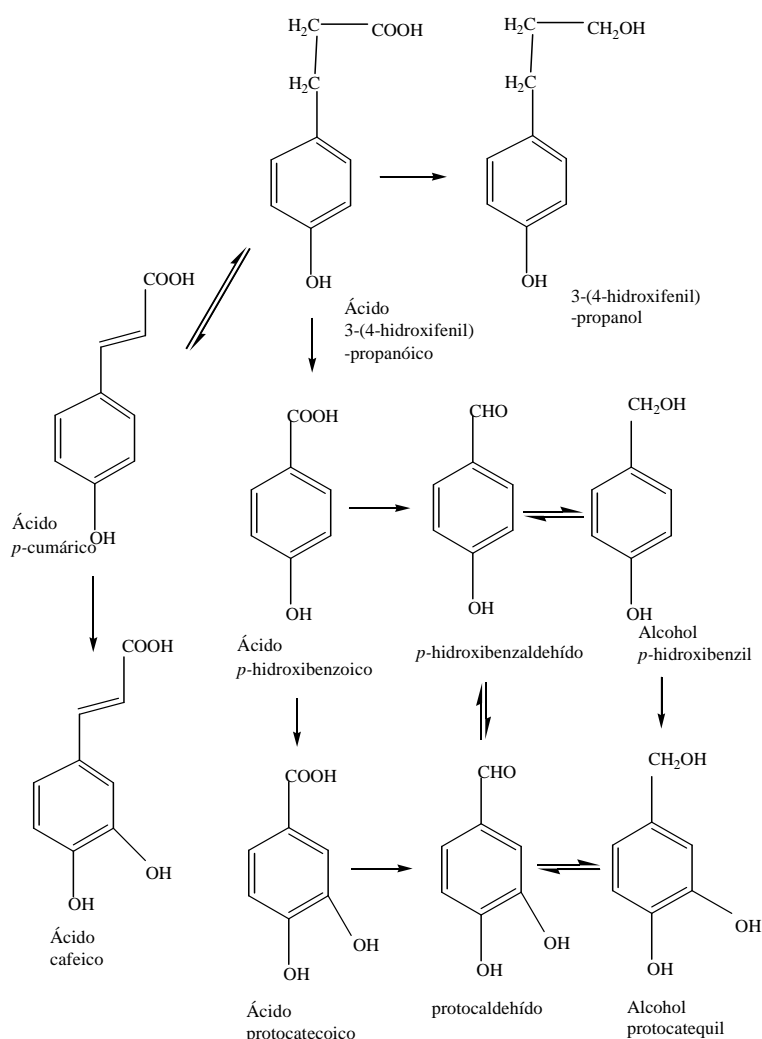


Figura 2.20. Biotransformación del ácido *p*-cumárico.

### 2.5.3 BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO CAFÉICO Y CLOROGÉNICO

Los ácidos clorogénicos son una familia de ésteres formados entre ciertos ácidos cinámicos y el ácido quínico. El más representativo es el ácido clorogénico (5-cafeoilquínico), que se encuentra en cantidades importantes en el café (350-1000 mg/l) (Clifford, 2000). El ácido clorogénico es hidrolizado para la obtención de ácido caféico (Figura 2.21), por la enzima clorogénico hidrolasa (Asther *et al.*, 2005).

El ácido caféico posee propiedades antioxidantes importantes, con múltiples mecanismos de inmovilización de radicales libres, quelación de metales, e inhibición de enzimas específicas responsables de la formación de

hidroperóxidos (Asther *et al.*, 2005). El ácido caféico es biotransformado por células inmovilizadas de cultivos de *C. frutescens*, originando como producto capsaicina y vainillina (Ramachandra y Gokare, 2000).

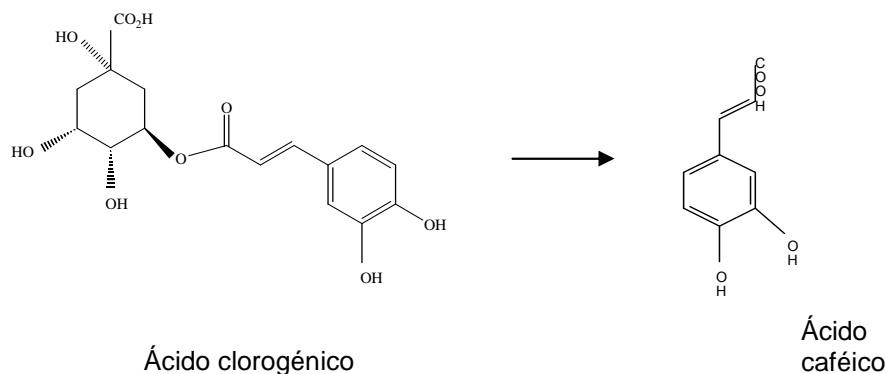


Figura 2.21. Biotransformación del ácido clorogénico

El estudio de la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos para la producción de antioxidantes y precursores de aromas se ha centrado en la biotransformación del ácido ferúlico. Pocos reportes hay de la biotransformación del ácido clorogénico y *p*-cumárico, por ello la exploración de los mecanismos de biotransformación en sistemas líquido y sólido es un complemento a la información reportada previamente.

## 2.6 TRABAJOS REALIZADOS SOBRE LA PULPA DE CAFÉ

El aprovechamiento de la pulpa de café y sus componentes ha sido ampliamente abordado por diversos investigadores, particularmente en nuestro grupo de investigación desde el año de 1986. Entre los trabajos más recientes se encuentra el de Torres-Mancera (2008), el de Ruíz-Sánchez (2002) quienes trabajaron sobre las enzimas cafeoil, feruloil y *p*-cumaroil esterases. Pérez-Morales (2008), estudio la producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido en pulpa de café.

También se han realiza estudios de bioprocesos con bacterias lácticas. Contreras-Domínguez, 2002 y Guzmán-López, 2009, realizaron estudios sobre la degradación de ácido gálico con bacterias lácticas.

En cuanto a estudios con hongos filamentosos se encuentran el de Gutiérrez-Sánchez (2000), que desarrolló el tema de la degradación de cafeína en presencia de ácido tánico por *Penicillium commune* v33a25” y en 2003 Nava-Villagómez la producción de esporas de *Penicillium commune* a nivel laboratorio y semipiloto con pulpa de café.

En los últimos años la demanda de compuestos aromáticos y antioxidantes se ha incrementado sustancialmente, por lo que una opción interesante es obtener estos compuestos a través de bioprocesos, para que sean considerados como naturales. En este sentido, el desarrollo de este trabajo aporta información para la obtención de precursores de antioxidantes y aromas a través de la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos en cultivos líquido y sólido.

---

*CAPÍTULO 3*  
*JUSTIFICACIÓN*

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la demanda de aromas y aditivos alimentarios se ha incrementado sustancialmente. En Europa y EUA la obtención de éstos compuestos por procesos biotecnológicos es una de las vías para que puedan ser denominados productos naturales (Barghini *et al.*, 1999).

Actualmente, la biotecnología ha desarrollado diversas metodologías para la obtención de moléculas naturales de alto valor agregado a partir de subproductos agrícolas. La pulpa de café es un subproducto agrícola, en México la producción es alta, 707.35 millones de toneladas en el año de 2008 (INEGI 2009); este subproducto agrícola genera un problema de contaminación ambiental debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno y rápida fermentación. Pero también posee cantidades interesantes de ácidos hidroxicinámicos que pueden ser biotransformados para la obtención de antioxidantes y precursores de aromas.

La biotransformación es una herramienta amigable al ambiente, a diferencia de la síntesis química, debido a la escasa generación de solventes. Los procesos biotecnológicos de transformación, pueden ser realizados por hongos filamentosos en cultivo sólido, que a diferencia del cultivo tradicional, se reportan altos títulos enzimáticos (Hölker y Lenz, 2005).

Como una contribución para el aprovechamiento de la pulpa de café, en este trabajo se estudia la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos para la obtención de moléculas de alto valor agregado para la industria alimentaria y farmacéutica. Para llevar a cabo la biotransformación, se usaron los sistemas de fermentación en medio sólido y líquido con mohos del género *Aspergillus*, de la colección UAM-IRD. Estas cepas fueron aisladas de las zonas cafetaleras de Veracruz y Chiapas (Roussos *et al.*, 1989).

---

## *CAPÍTULO 4*

### *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*



## **4. HIPÓTESIS**

En cultivo sólido se obtienen mayores productividades y mayor diversidad de compuestos de la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la pulpa de café usando cepas fúngicas aisladas del nicho biológico del café al comparar los compuestos y productividades obtenidos en cultivo líquido.

### **4.1 OBJETIVOS**

#### **4.1.1 OBJETIVO GENERAL**

Biotransformar ácidos hidroxicinámicos en antioxidantes y precursores de aromas, a partir de cultivos de mohos por fermentación en medio líquido y sólido.

#### **4.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

4.2.1 Seleccionar mohos con capacidad para transformar ácidos hidroxicinámicos como el ácido *p*-cumárico, caféico, ferúlico, clorogénico y vainillínico.

4.2.2 Estudiar los productos de la transformación del ácido clorogénico por *A. niger* C23308 en cultivo en medio líquido.

4.2.3 Estudiar los productos de la transformación del ácido *p*-cumárico en cultivo sólido y líquido por hongos del género *Aspergillus*.

4.2.4 Estudiar los productos de la transformación del ácido ferúlico en cultivo sólido y líquido por *A. niger* C28B25 y su cepa diploide *A. niger* DAR 2.

4.2.5 Purificar la enzima ferúlico- descarboxilasa del extracto enzimático de *A. niger* DAR 2.

4.2.6 Evaluar las biotransformaciones fúngicas en base a la productividad, la conversión y rendimientos de formación de productos a partir de los ácidos hidroxicinámicos.

---

*CAPÍTULO 5*

*MATERIALES Y MÉTODOS*

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 REACTIVOS**

- Solventes: acetona, cloroformo, metanol puro, buffers de referencia pH 4 y 7 (JT Baker).
- Compuestos fenólicos: ácido *p*-cumárico, clorogénico, ferúlico, caféico, vainillínico, protocatecónico, *p*-hidroxibenzoico, vainillina, alcohol vainillílico, todos de Sigma –Aldrich.
- Medios de cultivo preparados: agar papa dextrosa y Czapek (Difco).

### **5.2 MICROORGANISMOS**

Se estudiaron 19 cepas pertenecientes a la colección UAM-IRD (Tabla 5.1). De esta colección, 5 cepas fueron identificadas Para la identificación de cepas se usó la técnica el gen de tubulina (anexo 2). Los hongos fueron cultivados en medio café y medio pulpa de café, para su conservación a corto plazo. Para la conservación a largo plazo se realizaron preparaciones en viales con sílica. Los hongos fueron propagados en medio agar papa dextrosa (PDA). Las cepas se almacenaron a 4°C.

También se estudiaron 4 cepas modificadas genéticamente de la cepa *A. niger* C28B25. Las cepas haploides, Aw 96-4, la cepa diploide DAR 2 y la cepa autodiploide AD96-4 (Tabla 5.1).

Las cepas modificadas fueron proporcionadas, por el Dr. Octavio Loera Corral de la UAM Iztapalapa. Las cepas se resembraron en medio Czapek, se incubaron a 30°C por 120 h y posteriormente fueron almacenadas a 4°C.

Tabla 5.1 Cepas fúngicas estudiadas

<i>Cepas silvestres</i>	<i>Cepas modificadas</i>
<i>A. niger</i> Aa 20	<i>A. niger</i> Aw96-3
<i>A. niger</i> C28B25	<i>A. niger</i> Aw 96-4
<i>A. tamarii</i> V12307	<i>A. niger</i> AD96-4
<i>A. awamorii</i> NRRL 3112	<i>A. niger</i> DAR 2
<i>A. niger</i> : C17309	
<i>A. niger</i> C28312	
<i>A. niger</i> C23308	
<i>P. commune</i> V33A25	
<i>A. niger</i> C16310	
<i>P. chrysosporium</i>	
<i>P. variotii</i>	
<i>Penicillium</i> sp. V26316	
V33306	
C11B315	
C23B311	

### 5.3 MEDIOS DE CULTIVO

#### 5.3.1 MEDIO CAFÉ

El medio café se preparó con el café Grand Mère (Kraft Foods), preparado en agua destilada, posteriormente se agregaron los otros elementos del medio. La composición del medio fue la siguiente (g/l): café 40, sacarosa 2,  $K_2HPO_4$  1.3,  $NaH_2PO_4$  0.12,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.3, Agar 20.

#### 5.3.2 MEDIO PULPA DE CAFÉ

La pulpa de café fue proporcionada por el beneficio “Cafés Finos”, localizado en Coatepec Ver, de la empresa Agroindustrias Unidas de México S.A. de C.V. incorporada al consejo Regulador del Café en el Estado de Veracruz.

La pulpa se colectó del despulpador del beneficio húmedo, se secó a 60°C por 24h, hasta una humedad de 5%. La pulpa se limpió manualmente, para

eliminar hojas, granos de café, ramas, etc. y fue molida con una licuadora Oster, hasta obtener un polvo fino, posteriormente se tamizó para obtener un tamaño de partícula de 0.8 mm. La pulpa se pesó y se resuspendió en agua tibia y posteriormente se agregaron los otros componentes del medio. La composición del medio fue la siguiente (g/l): pulpa de café 60, sacarosa 2,  $K_2HPO_4$  1.3,  $NaH_2PO_4$  0.12,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.3,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.3, Agar 20.

### 5.3.3 MEDIO A

La composición del medio A fue la siguiente (g/l): maltosa 18, glucosa 3, tartrato de amonio 1.842,  $KH_2PO_4$  0.2,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.0132,  $MgSO_4$  0.5, extracto de levadura 0.5 (Asther *et al.*, 2002)

### 5.3.4 MEDIO B

La composición del medio B fue la siguiente (g/l): Sacarosa 3,  $NaNO_3$  3,  $K_2HPO_4$  1,  $MgSO_4$  0.5, KCl 0.5, extracto de levadura 3.

## 5.4 SELECCIÓN DE CEPAS

Se utilizaron 5 compuestos fenólicos y dos concentraciones 200 y 800 mg/l, las concentraciones se ajustaron a partir de una solución madre.

Los ensayos se realizaron en frascos de 35 ml (previamente forrados con papel aluminio), se colocaron 10 ml de medio de cultivo, para cada uno de los 5 compuestos fenólicos: ácido *p*-cumárico, ácido caféico, ácido clorogénico ácido ferúlico y vainillínico, previamente diluidos en metanol puro, los cuales fueron filtrados (Membrana Millipore 0.2  $\mu m$  de nylon) antes de la adición al medio B, previamente esterilizados. Los frascos se incubaron a 30°C, con agitación constante de 100 rpm por 72h. Los experimentos se realizaron por duplicado y cada unidad experimental fue independiente.

### 5.4.1 CULTIVO PARA LA FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO

Las unidades experimentales utilizadas se describen en la sección 5.3, en esta etapa el nivel de inóculo fue de  $10^7$  esporas /ml. Los frascos se incubaron a 30°C, con agitación constante a 100 rpm y se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo.

#### **5.4.2 EXTRACTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS**

Para la identificación compuestos, se realizaron fermentaciones en matraces Erlenmeyer de 500 ml (forrados con papel aluminio), se colocaron 300 ml de medio de cultivo B, se agregó el compuesto fenólico de una solución madre para obtener una concentración final de 800 mg/l y el inóculo fue de  $10^7$  esp/ml. Los matraces se incubaron a 30°C, con agitación constante de 100 rpm por 72 horas.

#### **5.5 CULTIVO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO (FMS)**

Se utilizó PUF (espuma de poliuretano), como soporte inerte, el cual previamente fue lavado, secado a 60°C y tamizado para obtener un tamaño de partícula de 0.8 mm-1.0 cm, aproximadamente. Se emplearon columnas de vidrio de 22 cm de largo y 50 mm de diámetro, las cuales se empacaron con aproximadamente 50 gramos de materia húmeda. La materia húmeda al inicio de la fermentación estuvo compuesta por el soporte impregnado con el medio de cultivo correspondiente (A ó B), las esporas se inocularon a una concentración de  $10^7$  esp/ml. La humedad al inicio de la fermentación fue de 70%. Las columnas se incubaron a 30°C en un baño de agua a temperatura constante

A las columnas se les pasó aire húmedo por la parte inferior con un flujo de 14 ml/min. Los gases fueron colectados a la salida de las columnas y analizados en línea con un cromatógrafo de gases equipado con un detector de conductividad térmica acoplado a la computadora, equipada con un programa de integración de CHROMA, que analiza los gases en línea durante la fermentación.

#### **5.6 PREPARACIÓN DEL INÓCULO**

La suspensión de esporas se obtuvo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de PDA, incubados a 30°C por 96h. Posteriormente se agregaron 25 ml de solución Tween 80 al 0.01% (v/v), se realizó una dilución 1:10 para su observación al microscopio (Olympus BX40) para poder realizar el conteo de

esporas en la cámara de Neubauer. El número de esporas se calculó por medio de la fórmula:

$$NE = 1 \times 10^4 * FD * e * C$$

Donde:

NE: Concentración de esporas

FD: Factor de dilución

e: El promedio del número de esporas contadas.

C: Número de cuadros empleados en la cámara de Neubauer

## **5.7 PRODUCCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO DE LA CEPA *A. niger* DAR 2**

La obtención del extracto crudo enzimático de *A. niger* DAR 2, se obtuvo a las 72 h de fermentación con el medio de cultivo B. La biomasa se filtró al vacío, con papel Whatman No. 40 y un embudo de vacío, al sobrenadante se le denominó extracto extracelular. Para la obtención del extracto intracelular, la biomasa fue molida con nitrógeno líquido, con la ayuda de un mortero, hasta la obtención de un polvo fino. Se agregó buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 6 y se centrifugó a 4500 rpm por 45 minutos. El sobrenadante y el botón fueron separados y refrigerados a 4°C.

Se realizó el ensayo enzimático con el extracto extracelular e intracelular para determinar si la enzima de interés era intracelular o extracelular.

## **5.8 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

### **5.8.1 FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO (FML)**

El contenido de los frascos se filtró una a través de filtros de papel Whatman 41, previamente tarados. El filtrado se almacenó a -4°C y al filtro se le determinó el contenido de biomasa por el método de peso seco (60°C por 24 horas).

En el filtrado se determinó el pH, la concentración de amonio, azúcares, sustratos y productos. Los métodos de análisis se describen en la sección 5.10.

### 5.8.2 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO (FMS)

Una vez finalizada la fermentación, las columnas fueron pesadas, la materia fermentada fue extraída de las columnas de vidrio y fue prensada con una jeringa de 50 ml. Las muestras obtenidas después del prensado fueron filtradas y se les determinó la concentración de amonio, Aw, Humedad, pH, concentración de azúcares, sustrato y producto. Los métodos de análisis se describen en la sección 5.10.

### 5.8.3 EXTRACTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS

Al término de la incubación, el contenido de los matraces fué filtrado con papel Whatman 40. El extracto fue sometido a extracciones sucesivas con cloroformo. Se realizaron 3 extracciones con un volumen aproximado de 50 ml. El solvente fue evaporado a 40°C a baja presión en un rotavapor. Los extractos fueron solubilizados en 2 ml de metanol puro y posteriormente analizados por cromatografía preparativa (CP), cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## 5.9 TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 5.9.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (CCF)

La cromatografía en capa fina es una técnica analítica cualitativa y muy versátil, que se basa en el principio de reparto entre dos fases: la fase estacionaria (gel de sílice Merck 60F 254) y la fase móvil (tolueno, dioxano y ácido acético). El soluto de interés (compuesto problema), se adherirá a la fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a la afinidad por la fase estacionaria. En esta técnica existen métodos de revelado, que pueden ser químicos o físicos, en nuestro estudio utilizamos un método físico, la luz ultravioleta onda corta (210 y 254 nm). La expresión de resultados en esta técnica se hace por medio del R<sub>f</sub> (Ratio front), que mide la retención de un componente (Skoog, 2005).

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen del compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}}$$



Las muestras filtradas de la fermentación se analizaron por cromatografía en capa fina, con la técnica modificada reportada por Hooper and Mahadevan (1997) modificada. En nuestro estudio se sustituyó el benceno por un derivado de este hidrocarburo con menor grado de toxicidad (Seyhan, 2000), quedando la composición de la fase móvil de la siguiente forma (v/v): tolueno, 1,4-dioxano, ácido acético (90:25:4). Se utilizaron placas cromatográficas de gel de sílice 60F<sub>254</sub> (Merck), donde se aplicaron alícuotas de 6 µl de las muestras con 0.3 cm de distancia entre cada muestra. Una vez secas las muestras, se colocó la placa en la cámara cromatográfica saturada con la fase móvil, se corrieron las muestras y cuando estas alcanzaron el frente de la placa (el solvente se encontraban a 0.5 cm de la placa), esta fue retirada de la cámara y se dejó secar en la campana de extracción, posteriormente las placas fueron reveladas con luz UV a 210 y 254 nm.

La identificación de compuestos se realizó comparando los Rf de las muestras con los estándares. Los compuestos de referencia utilizados fueron: ácido clorogénico, *p*-cumárico, caféico, ferúlico, vainillínico y vainillina, a una concentración de 1 mg/ml. En la Tabla 5.1 se enlistan los valores de Rf de los compuestos de referencia.

Tabla 5.1. Valores de Rf de los compuestos de referencia

Compuesto	Valor de Rf
Ácido clorogénico	0.28
Ácido caféico	0.32
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.56
Ácido ferúlico	0.62
Ácido vainillínico	0.72

#### 5.9.2 CROMATOGRAFÍA PREPARATIVA (CP).

La cromatografía preparativa es una técnica que tiene el mismo principio que la cromatografía en capa fina. Difiere de la técnica básica en muchos aspectos, desde la preparación de la muestra, ya que debe hacerse con menor cantidad de solvente. La aplicación de la muestra se realiza mediante una pipeta

Pasteur o jeringuilla a lo ancho de la placa en una línea recta y se aplica en diferentes capas hasta agotar la muestra.

Una vez colocada la muestra, el procedimiento es similar a la técnica básica de cromatografía en capa fina. La placa de vidrio se coloca en la cámara con el solvente, hasta alcanzar el frente de la misma. Las placas cuentan con un indicador fluorescente para su revelado con luz ultravioleta las manchas de los diferentes compuestos.

Una vez localizados los compuestos, éstos se extraen de la sílica (placa de vidrio), uno a uno, con la ayuda de una espátula. Posteriormente se coloca cada componente en un matraz y se mezcla con un disolvente. Una vez disuelto el compuesto se filtra varias veces para separar el compuesto y la fase estacionaria. Una vez separado se elimina el disolvente, con lo cual se obtiene el componente separado (Skoog 2005; Robertson and Williams, 2009).

Los extractos concentrados fueron resolubilizados en metanol puro se analizaron en placas de vidrio de sílica gel (Macherey-Nagel, Germany) donde se aplicaron en forma horizontal con pipeta Pasteur en repetidas ocasiones hasta aplicar completamente los 2 ml del extracto concentrado. Una vez seca la muestra, se colocó la placa en la cámara cromatográfica saturada con la fase móvil, compuesta de tolueno/dioxano/ácido acético (90/25/4) (Hooper and Mahadevan, 1997). Las placas se revelan con luz ultravioleta.

Cada fracción se colocó en un matraz Erlenmeyer de 125 ml y se realizaron alrededor de tres lavados con acetona, para separar los compuestos de la sílica. El solvente fue centrifugado a 10000 rpm por 15 min y el sobrenadante fue filtrado a través de membranas de 0.45 µm de nylon y posteriormente evaporado a 40 °C al vacío.

### 5.9.3 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

#### ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

La determinación de la concentración de los sustratos (ácido clorogénico, caféico, ferúlico, vainillínico y *p*-cumárico), así como la de los productos de la

biotransformación, se efectuó con un equipo Shimadzu, equipado con una bomba cuaternaria Liquid Chromatogram LC20A, acoplado a un detector de arreglo de diodos SPD M20A, se utilizó una columna Polaris 5 Amide C18 Varian (4.6 x 200 mm) en condiciones isocráticas. La composición de la fase móvil fue la siguiente (v/v): agua: metanol: ácido acético (64:35:1) según Barghini *et al.*, (2007) a un flujo de 1.0 ml/min.

Se elaboraron las curvas patrón de concentración del ácido vainillínico, *p*-cumárico, clorogénico, caféico y ferúlico, en un rango de 0 - 500 mg/l (Anexo 3), los cuales fueron solubilizados en metanol y filtrados (Millipore 0.2  $\mu$ m) . A partir de las curvas patrón de concentración, se determinó la concentración de los compuestos de interés.

#### ANÁLISIS DE AZÚCARES

La concentración de azúcares se determinó con el método reportado por Tovar *et al.*, (2008). Se usó un equipo Perkin Elmer Binary LC Pump 250 acoplado al detector Perkin Elmer LC 30 RI. La columna usada fue la siguiente: Phenomenex Rezex Organic Acid (7.8 x 300 mm) en condiciones isocráticas. La fase móvil utilizada fue de ácido sulfúrico 5 mN con un flujo constante de 0.5 ml/min y a 40°C.

Los azúcares analizados fueron: sacarosa, glucosa, maltosa y fructosa. Se elaboraron curvas patrón de concentración en un rango de 0 - 10 g/l. Con ellas, se determinó la concentración de los azúcares (Anexo 4).

#### 5.9.4 CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG).

##### CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA AL DETECTOR DE MASAS.

La espectrometría de masas es una técnica basada en el bombardeo electrónico o iónico de una muestra. Esta técnica utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa-carga. La finalidad es obtener de manera directa la masa molecular del compuesto de interés. Las fracciones puras, se analizaron en un cromatógrafo

de gases (Agilent GC System 6890), acoplado a un detector de masas (Agilent 5975 BVL). Se usó una columna capilar HP-5 MS con una longitud de 30m y un diámetro de 250  $\mu$ m, con 5% de fenil-metil-polisiloxano como fase móvil.

Los compuestos fueron analizados por el método reportado por Huang *et al.*, (1993), con el objeto de mejorar la separación y resolución de las muestras. Se modificó la temperatura del inyector y detector a 220° y 270°C, respectivamente. Con el objeto de mejorar la separación y resolución de las muestras. El gradiente utilizado fue al inicio de 60°C, con incrementos de 5 grados por minuto hasta 160°C, manteniéndose durante un minuto. La temperatura del inyector y detector se mantuvieron a 200 y 270°C, respectivamente.

Las muestras fueron interpretadas de acuerdo a su correspondiente patrón de descomposición.

#### DETERMINACIÓN DE CO<sub>2</sub>

El crecimiento microbiano se midió indirectamente a través de la producción del CO<sub>2</sub> durante la FMS. El análisis del CO<sub>2</sub> se realizó con el cromatógrafo de gases GOW-MAC Instruments Co, Serie 580, reportado por Saucedo *et al.*, (1994); con helio como gas acarreador, la temperatura del inyector y detector se mantuvieron a 80°C. Se empleó una columna empacada CTR I de Alltech de 50 mm de diámetro, la cual se mantuvo a 50 °C y el flujo que se utilizó fue de 14 ml/min.

El análisis con este equipo permitió analizar diferentes gases como CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Cada gas tiene una conductividad térmica diferente, por lo que se estableció una curva de calibración previa al análisis, los valores de referencia de los gases se establece en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Tiempos de retención de los gases de referencia.

Gas	Tiempo de retención (min)
CO <sub>2</sub>	0.85
O <sub>2</sub>	2.2
N <sub>2</sub>	3.15

La integración y el cálculo de los porcentajes de los diferentes gases se realizaron con el programa Chroma systems (Dijon, Francia).

#### 5.9.5 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica que sirve para determinar directamente la estructura de moléculas principalmente orgánicas a nivel atómico (Rouessac y Rouessac, 2003).

Las fracciones puras de los diferentes compuestos se analizaron por Resonancia Magnética Nuclear. El análisis se realizó con un equipo marca Bruker DMX 500 Mhz, con cloroformo deuterado como solvente (CDCl<sub>3</sub>) y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se reportaron en (Hz) y los picos de multiplicidad para el espectro del protón de la siguiente manera: s, singulete; d, doblete; m, multiplete; brs, broad singlet.

#### 5.9.6 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

La biomasa se determinó por gravimetría, los filtros de papel Whatman No. 42, fueron previamente puestos a peso constante, la biomasa se colectó en los filtros y se colocaron en la estufa a 60° por 24 h.

#### 5.9.7 DETERMINACIÓN DEL pH

El pH se midió con un potenciómetro Conductronic pH120, previamente calibrado con buffers de referencia pH 4 y 7 a 25°C. La medición se hizo a los filtrados y extractos obtenidos de las fermentaciones, previamente agitados en un vortex.

#### 5.9.8 DETERMINACIÓN DE AMONIO

Para cuantificar la concentración de amonio, se utilizó la técnica del electrodo selectivo de amoniaco, descrito en Standard Methods APHA, 1992. En un matraz aforado de 125 ml se adiciona 1 ml de muestra problema, se afora con agua desionizada, la solución se alcaliniza con NaOH 10N, para desprotonar el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y formar el amoniaco ( $\text{NH}_3$ ). La medición se realizó bajo agitación constante por 3 min mientras se toma la lectura con un potenciómetro Conductronic pH 120 con el electrodo Ammonia Combination. Los valores se interpolaron en una curva patrón de concentración de amonio en un rango de 0-500 mg/l (Anexo 5). Las curvas patrón representan gráficamente el potencial del electrodo (mV) en función de concentraciones de amonio en escala logarítmica.

#### 5.9.9 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Se pesaron aproximadamente 0.5 g de materia fermentada. La humedad se determinó con una termobalanza Ohaus MB45. El equipo funciona sobre la base del principio termogravimétrico. Al comienzo de la medida, el analizador de humedad determina el peso de la muestra, a continuación, la muestra se calienta y seca rápidamente por medio de la lámpara de halógeno. Durante la operación, el equipo determina continuamente el peso de la muestra y determina el resultado de humedad como porcentaje (%) de la muestra.

#### 5.9.10 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE AGUA ( $A_w$ )

La actividad de agua ( $A_w$ ), es la relación de la presión de vapor del material entre la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. El principio de medición del equipo Aqua Lab se basa en la obtención del punto de rocío por condensación sobre un espejo enfriado, este método ofrece exactitud elevada, fácil uso y precisión en la medida, además la lectura toma unos cuantos minutos. Para determinar la  $A_w$  se colocaron aproximadamente 2 g de la materia fermentada en los contenedores de medición del equipo AquaLAB CX2 de Labsen Scientific, previamente calibrado con agua destilada, ajustando el valor de  $A_w$  a 1.

#### 5.9.11 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La determinación de proteína se realizó por el método reportado por Lowry *et al.*, (1951). Este método consta de dos etapas: en la primera, los iones  $\text{Cu}^{2+}$ , en medio alcalino, se unen al péptido y forma complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos tienen un color azul claro; se exponen los residuos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El  $\text{Cu}^{2+}$  se mantiene en solución alcalina al formar un complejo con el tartrato de sodio y potasio. En la segunda etapa, el cobre actúa como catalizador de la reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por parte de los grupos fenólicos de los residuos de tirosina. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los fenoles da lugar a un complejo de color azul intenso (García y Duhalt, 1998). La preparación de los reactivos se describe en el Anexo 6.

Para determinar la concentración de proteína se realizó una curva patrón de seroalbúmina con un intervalo de 0-100  $\mu\text{g/ml}$  (Anexo 6.1).

#### 5.9.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FERÚLICO DESCARBOXILASA EN EL EXTRACTO CRUDO DE LA CEPA *A.niger* DAR 2

La actividad ferúlico descarboxilasa se determinó por medio de la descarboxilación del ácido ferúlico a 4-vinilguayacol, el cual fue determinado por HPLC.

Las condiciones del ensayo enzimático fueron las siguientes: en un vial de 250  $\mu\text{l}$ , se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de extracto, 50  $\mu\text{l}$  de buffer de fosfato de sodio 100 mM, pH 6.5; 100  $\mu\text{l}$  de agua MiliQ y ácido ferúlico a una concentración de 2.5 mM. El ensayo se realizó por duplicado, con el respectivo blanco, el cual fue preparado de la misma manera que las muestras con la adición de 30  $\mu\text{l}$  de TCA desde el inicio del ensayo. La reacción se incubó a 30°C y la toma de muestra se hizo cada 4 h. La reacción fue detenida con la adición de 30  $\mu\text{l}$  de TCA. Posteriormente la muestra fue filtrada y analizada por HPLC.

Una unidad de actividad enzimática (U), fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir 1  $\mu\text{mol}$  de 4- vinilguayacol por minuto.

#### 5.9.13 EFECTO DEL pH Y TEMPERATURA EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA INTRACELULAR DE LA CEPA *A. niger* DAR 2.

Los valores de pH ensayados para medir la actividad enzimática fueron: 4, 5, 6, 7 y 8. En el caso de pH 4 y 5 se preparó buffer de acetatos 100 mM; para pH 6, 7 y 8 se empleó buffer de fosfatos 100 mM.

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la actividad del extracto intracelular crudo, se incubó la reacción a las siguientes temperaturas: 30, 40, 50, 60, 70 y 80°. Los ensayos enzimáticos se realizaron como se describe en la sección anterior.

#### 5.9.14 PURIFICACIÓN POR INTERCAMBIO IÓNICO DE LA ENZIMA FERULICO-DESCARBOXILASA DE LA CEPA *A. niger* DAR 2

En la primera etapa de purificación de la descarboxilasa del ácido ferúlico, se utilizó la técnica de cromatografía de intercambio iónico. Esta técnica se basa en las diferencias en signo y magnitud de la carga eléctrica neta de las proteínas a un valor de pH determinado. La afinidad de cada proteína a los grupos cargados de la columna está determinada por el pH y por la concentración de iones en solución (concentración salina) que compiten con la proteína en la interacción con la matriz.

Para el desarrollo de esta técnica se utilizó una columna MONOQ (Biorad), de 5 ml, se eluyó con buffer de acetatos 100 mM, pH 5 con azida de sodio al 5% y buffer de acetato con cloruro de sodio 2mM, pH 5. Las diferentes fracciones fueron colectadas y posteriormente dialisadas con tubo de diálisis de 10000 Da en buffer de fosfatos pH 6 100mM. Para poder evaluar la actividad enzimática bajo las condiciones óptimas de pH y temperatura.

#### 5.9.15 PURIFICACIÓN POR FILTRACIÓN EN GEL DE LA ENZIMA FERÚLICO-DESCARBOXILASA DE LA CEPA *A. niger* DAR 2

En una segunda etapa de purificación de la enzima se utilizó la técnica de filtración en gel. Esta técnica se basa en la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Para la separación de la descarboxilasa del ácido ferúlico se utilizó una columna de filtración en gel 30 mm X 7.8 mm, empacada con polihidroximetacrilato (Bio- Rad), adaptada al equipo de HPLC (Agilent). El buffer de elución fue Tris 25 mM pH 8 con 100 mM de NaCl y 0.01% de azida



de sodio. Las fracciones obtenidas se interpolaron en la curva estándar de pesos moleculares proporcionada por BIORAD.

La fracción obtenida por intercambio aniónico que mostró actividad fue inyectada en la columna de filtración en gel y se obtuvieron diferentes fracciones.

#### 5.9.16 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron los análisis estadísticos ANOVA, t-student, Prueba de Tukey, con el programa NCSS-2000.

### 5.10 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

#### 5.10.1 RENDIMIENTOS Y CONVERSIONES MOLARES EN LAS REACCIONES DE BIOTRANSFORMACIÓN.

El rendimiento molar (%), de formación de producto con base al consumo de ácido hidroxicinámico respectivo ( $X$ ), fue expresada de la siguiente manera:

$$Y = \frac{P_f - P_0}{X_0 - XA_f}$$

Donde:

- $P_f$  es la concentración molar final de producto
- $P_0$  es la concentración inicial molar de producto.
- $X_0$  y  $XA_f$  son las concentraciones molares de ácido hidroxicinámico inicial y final, respectivamente.
- La conversión de ácido hidroxicinámico  $X$  (%), se expresó como sigue:

- Conversión (%) = 
$$\frac{XA_0 - XA_f}{XA_0} \times 100$$

### 5.10.2 ANÁLISIS DE GASES DE LA FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO

El análisis de los gases se determinó con el programa CHROMA para conocer la concentración de CO<sub>2</sub>. La concentración del CO<sub>2</sub>, se obtuvo a partir del área bajo la curva de velocidad de producción contra tiempo. Los resultados se expresaron en mg CO<sub>2</sub>/h g de materia sólida inerte (MSI).

---

## *CAPÍTULO 6*

# *SELECCIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS CON CAPACIDAD PARABIOTRANSFORMAR ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS*

## 6. SELECCIÓN DE LAS CEPAS FÚNGICAS CON CAPACIDAD PARA BIOTRANSFORMAR ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS

En este capítulo se describe el proceso de selección de cepas fúngicas, el criterio utilizado fue la capacidad de biotransformar ácidos hidroxicinámicos según la vía de referencia (Verpoorte, 2000) (Figura 6.1). Las cepas estudiadas fueron sometidas al proceso de selección evaluando dos concentraciones, 200 y 800 mg/l del ácido *p*-cumárico, caféico, ferúlico y vainillínico. Se establecieron estas concentraciones con el objeto de conocer la tolerancia y resistencia a la toxicidad de los compuestos fenólicos. La técnica analítica utilizada en esta etapa fue la cromatografía en capa fina, la cual es ampliamente utilizada, rápida y sencilla (Pascual *et al.*, 2002).

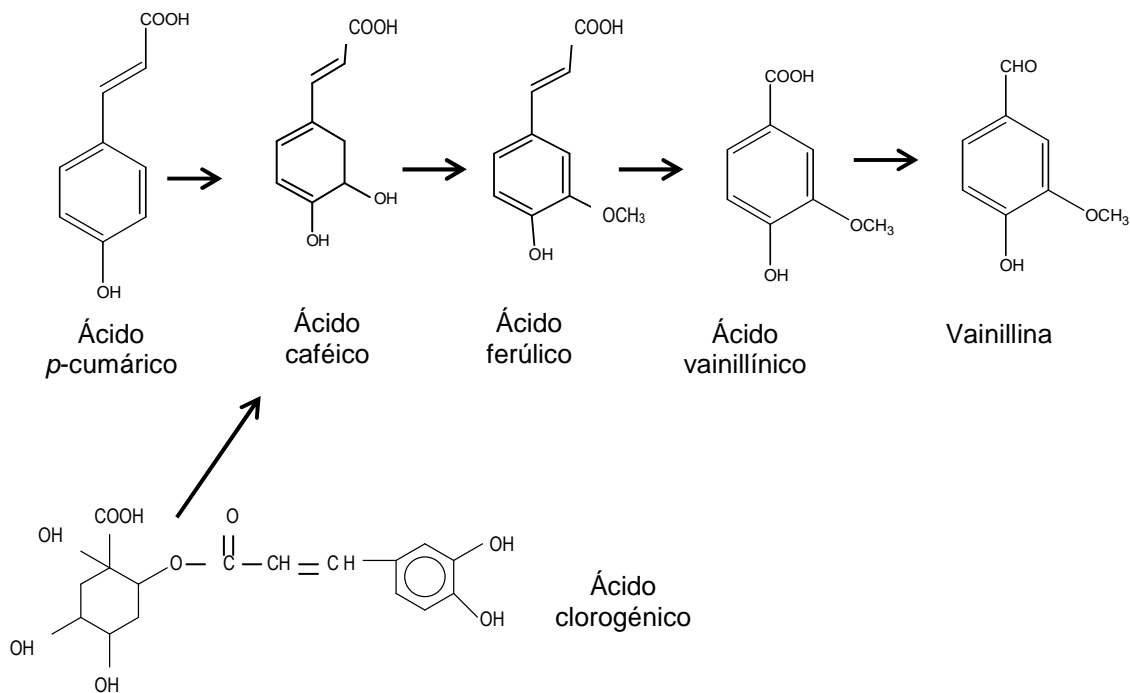


Figura 6.1. Vía de referencia para la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos por las cepas de hongos filamentosos.

Se hizo el análisis por cromatografía en capa fina de los extractos en los tiempos 0 y 72 h de fermentación. Este procedimiento se realizó para las 19 cepas estudiadas con cada uno de los diferentes sustratos, con las dos concentraciones y con el medio de cultivo B. Se compararon los resultados con las soluciones de referencia, para identificar la biotransformación de los

sustratos y la generación de los productos. Los resultados se muestran en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Selección de cepas fúngicas.

Sustrato (mg/l)	Cepas	Producto	Rf	Biomasa (mg/ml)
Ácido <i>p</i> -cumárico (800)	<i>A. tamaritii</i> V12307	Ácido caféico	0.32	1.3 + 0.04
	<i>A. niger</i> AD96-4	NI	0.79	3.2+ 0.07
	<i>A. niger</i> C17309,	NI	0.79	2.1+ 0.18
Ácido caféico (200)	<i>A. niger</i> C23308,	Ácido ferúlico	0.62	2.8+ 0.37
	<i>Penicillium</i> sp.V26316			2.4+ 0.32
Ácido clorogénico (800)	<i>A. niger</i> C23308,	Ácido caféico	0.32	3.5+0.4
	<i>A. niger</i> DAR 2			3.5+0.35
Ácido ferúlico (800)	<i>A. niger</i> C17309	Ácido vainillínico	0.72	2.1 + 0.84
	<i>A. niger</i> C28312			2.9 + 0.14
	<i>A. niger</i> DAR2			2.7 + 0.25
	<i>A. niger</i> C16310			2.2 + 0.14
	<i>Penicillium</i> sp.V26316			2.0 + 0.28
Ácido vainillínico (200)	<i>Penicillium</i> sp.V26316	Ácido ferúlico	0.62	2.2 + 0.34

NI: Producto no identificado.

De las 19 cepas fúngicas sólo ocho mostraron productos de la de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos. Tres cepas del género *Aspergillus* biotransformaron el ácido *p*-cumárico (Figura 6.2). La cepa *A.tamaritii* V12307 mostró la capacidad de biotransformar el ácido *p*-cumárico en

ácido caféico, reacción que es efectuada por la enzima fenolasa de la vía del ácido fenilpropenóico y cuya reacción consiste en adicionar un grupo hidroxilo al anillo aromático (Verpoorte, 2000).

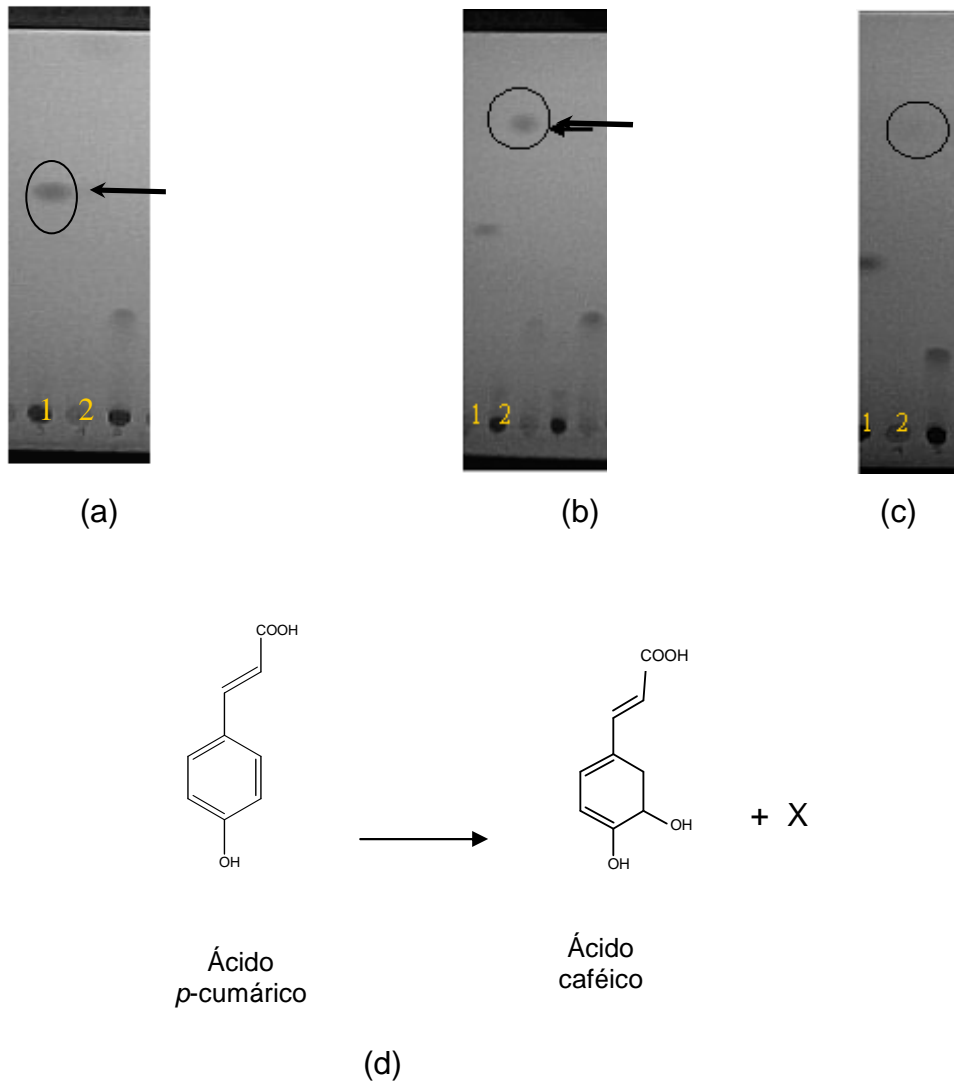


Figura 6.2. Cromatografía en capa fina de los productos de biotransformación del ácido *p*-cumárico (a) Placa de *A. tamaritii* V12307. La flecha muestra la ubicación del ácido caféico. (b) Placa de *A. niger* Ad96-4. (c) Placa de *A. niger* C17309. 1.  $t_0$  Ácido *p*-cumárico 800 mg/l; 2.  $t_{72}$  ácido *p*-cumárico 800 mg/l. Las flechas muestran la formación de un producto desconocido en las placas (b) y (c). (d) Reacción del ácido *p*-cumárico por las cepas fúngicas.

*A.niger* C17309 y *A.niger* AD96-4 biotransformaron el ácido *p*-cumárico a una concentración de 800 mg/l, en un compuesto con Rf de 0.79, el cual no corresponde a ningún compuesto de referencia disponible en el laboratorio. Este compuesto podría ser producto de una vía diferente a la propuesta, ya que se ha reportado su producción en *P. cinnabarinus* MUCL39533, *Paecilomyces variotii* MTCC 6581 y *Halomonas* sp. El mecanismo de biotransformación se lleva a cabo por la reducción de la cadena carboxílica y una vez que ésta es reducida, se presentan diferentes reacciones a nivel del anillo aromático (Estrada *et al.*, 2001; Sachan *et al.*, 2006; Abdelkafi *et al.*, 2006). En cuanto a los valores de biomasa, las tres cepas mostraron diferencias importantes después de 3 días de incubación con el ácido *p*-cumárico. *A. niger* AD96-4 presentó un valor de 3.22 mg/ml, seguida de *A. niger* C17309 con 2.11 mg/ml y la cepa *A. tamaritii* V12307 presentó la menor generación de biomasa (0.71 mg/ml).

Estos resultados de biomasa pueden estar relacionados con la tolerancia de los hongos a los diferentes compuestos presentes durante la reacción de biotransformación.

*A. niger* C23308 y *Penicillium* sp.V26316 biotransformaron el ácido caféico (Figura 6.3), una concentración de 200 mg/l, con el ácido ferúlico como producto principal. La reacción de biotransformación del ácido caféico en ácido ferúlico es catalizada por la enzima cafeato *o*- metiltransferasa ( EC 2.1.1.6), la cual introduce un grupo metilo en el anillo para formar el grupo OCH<sub>3</sub> del anillo aromático del ácido ferúlico (Inoue *et al.*, 1998).

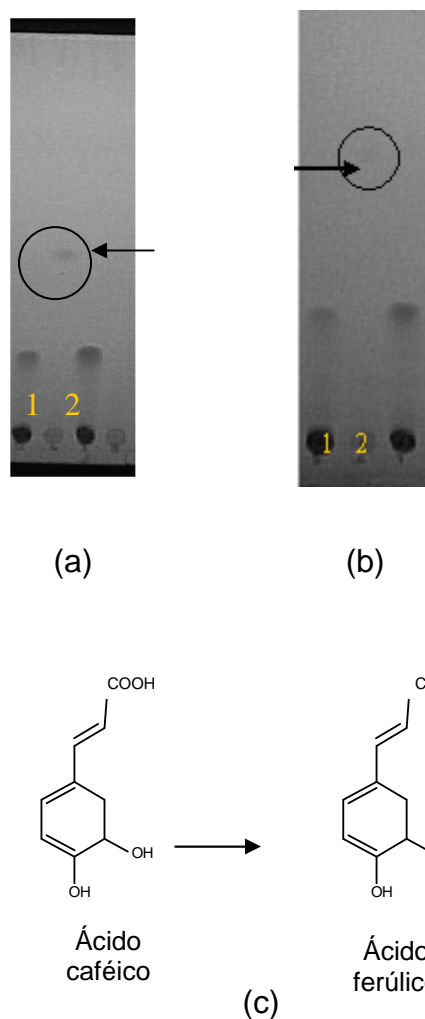


Figura 6.3. Placas cromatográficas de la biotransformación del ácido *caféico* a). Placa de *A. niger* C23308 b) *Penicillium* sp.V26316. 1.  $t_0$  Ácido *caféico* 200 mg/l; 2.  $t_{72}$  ácido *caféico* 200 mg/l. Las flechas muestran la ubicación de ácido *ferúlico* en ambas placas. c) Reacción del ácido *caféico* por las cepas fúngicas.

Los valores de biomasa final de *A. niger* C23308 y *Penicillium* sp V26316 no muestran diferencias significativas entre sí, fueron 2.87 y 2.47 mg/l para la cepa *A.niger* C23308 y *Penicillium* sp.V26316, respectivamente, lo que sugiere que las tres cepas fúngicas presentan la misma tolerancia frente al ácido *caféico* y a la concentración de producto. Aunque en este ensayo se probaron dos concentraciones, sólo se observaron productos de biotransformación en la concentración de 200 mg/l. Esto podría presentarse por una inhibición del crecimiento de las cepas fúngicas por el ácido *caféico* a mayores concentraciones, resultados que coinciden con lo reportado por Estrada *et al*,



(2003), donde se menciona que a concentraciones mayores de 350 mg/l de ácido caféico se presenta inhibición del crecimiento en *P. cinnabarinus* debido a la toxicidad del ácido *p*-cumárico.

*A. niger* C23308 y DAR 2 biotransformaron el ácido clorogénico en ácido caféico. Esta reacción ha sido ampliamente reportada (Smith *et al.*, 2003; Asther *et al.*, 2005; Benoit *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2008), incluso ésta se realiza en el tracto gastrointestinal humano (Nardini *et al.*, 2002). Los valores de biomasa para ambas cepas fueron de 3.59 (*A. niger* C23308) y 3.55 mg/ml (DAR 2), por lo que ambas cepas presentan una capacidad semejante para crecer en presencia de 800 mg/l de ácido clorogénico.

De las 19 cepas probadas, seis biotransformaron el ácido ferúlico, cuatro del género *Aspergillus* y una del género *Penicillium* (Figura 6.4). Los valores finales de biomasa en estas seis cepas, no presentaron diferencias entre sí, ya que todas alcanzaron concentraciones alrededor de 2 mg/ml. La biotransformación del ácido ferúlico en ácido vainillínico ha sido reportada en *Sporotrichum thermophile*, *Schizophyllum commune*, *Paecilomyces variotti* y *A. niger*, entre otros (Mathew y Abraham, 2006). La reacción es una degradación de la cadena propenóica del ácido ferúlico para formar el ácido vainillínico.

Los resultados obtenidos de la selección de cepas capaces de biotransformar los ácidos hidroxicinámicos mostraron que sólo 8 de las 19 cepas presentan la capacidad de biotransformar diferentes ácidos hidroxicinámicos, (Figura 6.1), así como otros intermediarios diferentes. Además los resultados muestran que cada cepa posiblemente posee capacidades enzimáticas diferentes para la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos, que se reflejó en la obtención de diferentes productos de biotransformación. El ácido clorogénico es hidrolizado en ácido caféico, reacción que lleva a cabo por la enzima clorogénico esterasa (Adachi *et al.*, 2008).

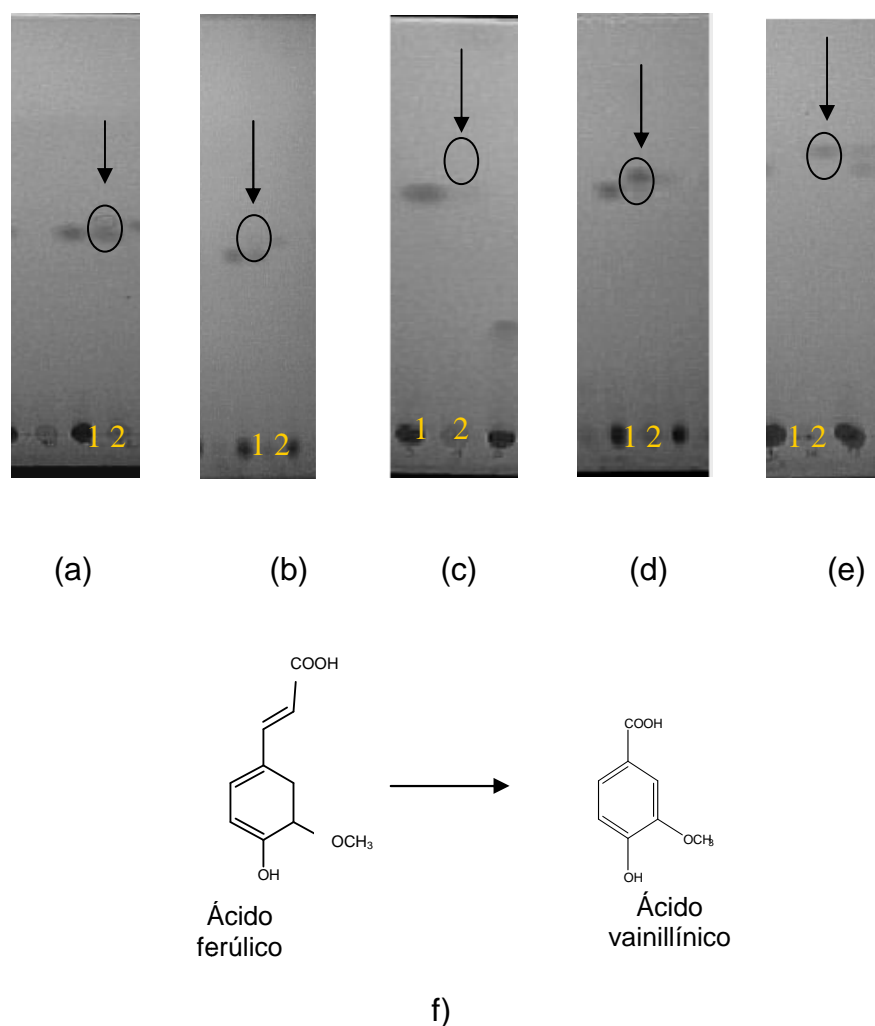


Figura 6.4. Placas cromatográficas de la biotransformación del ácido ferúlico. a). Placa de *A. niger* C17309, b) *A. niger* C28B315, c) *A. niger* DAR2, d) *A. niger* C16310, e) *Penicillium* sp.V26316. 1.  $t_0$  Ácido ferúlico 800 mg/l; 2.  $t_{72}$  ácido ferúlico 800 mg/l. Las flechas muestran la ubicación de ácido vainillínico en las placas. f) Reacción del ácido ferúlico por las cepas fúngicas.

El ácido *p*-cumárico fue biotransformado en un producto desconocido y en ácido caféico, lo que sugiere la presencia de la enzima 4- coumarato- 3 hidroxilasa, (Verpoorte, 2000) la cual introduce un grupo hidroxilo al anillo aromático, como se indica en la vía de referencia.

Por otro lado, el ácido caféico fue biotransformado en ácido ferúlico, esta reacción la lleva a cabo la catecol-3- metil transferasa, que introduce un grupo metilo al hidroxilo en posición meta del anillo aromático del ácido caféico para dar origen al ácido ferúlico

El ácido ferúlico fue biotransformado en ácido vainillínico, tal como se indica en la vía de referencia.

---

*CAPÍTULO 7*

*BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO  
CLOGÉNICO EN FML*

## **7. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO**

El ácido clorogénico es un éster y la hidrólisis de este compuesto produce ácido quínico y ácido caféico. Esta reacción es catalizada por la enzima extracelular clorogenato esterasa (EC 3.1.1.42). Actualmente se encuentra disponible la preparación comercial de esta enzima (<http://www.kikkoman.co.jp/bio/j/rinsyou/enzymes/>), que es utilizada para la prevención del oscurecimiento enzimático en la preparación de jugos, vinos y café (Schöbel and Pollmann, 1980; Smith *et al.*, 2003).

El ácido caféico posee propiedades antioxidantes y ha demostrado mayor actividad que el BHT (butil hidroxitolueno), antioxidante sintético ampliamente utilizado en la industria alimentaria (Kikuzaki *et al.*, 2002). El ácido caféico se utiliza en la fabricación de fármacos anticarcinogénicos, antioxidantes e inmunomoduladores (Saija *et al.*, 1999).

Por otro lado, el ácido quínico es utilizado para la producción de ácido shikímico, el cual es un precursor directo del oseltamivir, ingrediente activo del tamiflu, el cual es un antiviral selectivo contra la influenza (Adachi *et al.*, 2008).

Debido al alto valor agregado de los productos de la hidrólisis del ácido clorogénico, se estudió la biotransformación del ácido clorogénico. En la primera etapa se realizó un ensayo preliminar comparativo de la biotransformación del ácido clorogénico entre *A. niger* DAR 2 y *A. niger* C23308. Posteriormente se seleccionó *A. niger* C23308, se caracterizó su cultivo de 72 h, a través del consumo del sustrato, la generación de productos, la evolución del pH, la concentración de biomasa y el consumo de azúcares.

### **7.1 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA BIOTRANSFORMACIÓN EN CULTIVO LÍQUIDO DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO POR LAS CEPAS *A. niger* DAR 2 y *A. niger* C23308**

En la primera etapa del estudio, se utilizaron *A. niger* DAR 2 y *A. niger* C23308 en ensayos en FML con ácido clorogénico y medio de cultivo B. El análisis de

los extractos se realizó a las 72 h de fermentación y se midieron el pH, la concentración de sustrato, producto y de biomasa, después de 3 días de fermentación. Los resultados se muestran en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Resultados del estudio preliminar de las cepas *A. niger* DAR 2 y *A. niger* C23308 y su capacidad de biotransformar el ácido clorogénico.

Cepa	Sustrato (mg/l)	Producto (mg/l)	Rendimiento (%)	Biomasa (mg/ ml)	pH
<i>A.niger</i> DAR 2	Ácido clorogénico 800	Ácido caféico 107.4 ± 0.02	13.4	4.0 ± 0.35	6.6
<i>A.niger</i> C23308	Ácido clorogénico 800	Ácido caféico 442.5 ± 0.02	55.3	3.5 ± 0.45	6.1

En la Tabla 7.1 se observa que ambas cepas presentaron valores de pH final y concentración de biomasa semejantes. Se observa que *A. niger* C23308 mostró un mayor rendimiento en la biotransformación de ácido clorogénico en ácido caféico, el cual fue 4 veces mayor comparado con la cepa *A. niger* DAR 2.

Estos resultados mostraron que bajo las condiciones de estudio, ambas cepas posiblemente presentan diferentes actividades de clorogenato esterasa que es la enzima responsable de biotransformar el ácido clorogénico en ácido caféico. Se decidió utilizar la cepa *A. niger* C23308 para realizar estudios más detallados de la biotransformación del ácido clorogénico ya que mostró mejores resultados.

## 7.2 BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO CON LA CEPA *A. niger* C23308

En esta etapa del estudio de la biotransformación del ácido clorogénico, se realizó la cinética de biotransformación del ácido clorogénico por la cepa *A. niger* C23308, con el medio de cultivo B, como se detalla en la sección 5.3.1. La toma de muestras se realizó a intervalos de 12 h durante 72 h. Las muestras fueron tratadas como se describe en la sección 5.7.1 y a las alícuotas se les determinó el pH, el contenido de azúcares, el consumo de sustrato y la formación de productos.

La Figura 7.1 muestra el perfil de biotransformación del ácido clorogénico en ácido caféico por la cepa *A. niger* C23308 durante 72 h de fermentación. Se observa que el ácido clorogénico es biotransformado gradualmente durante la fermentación.

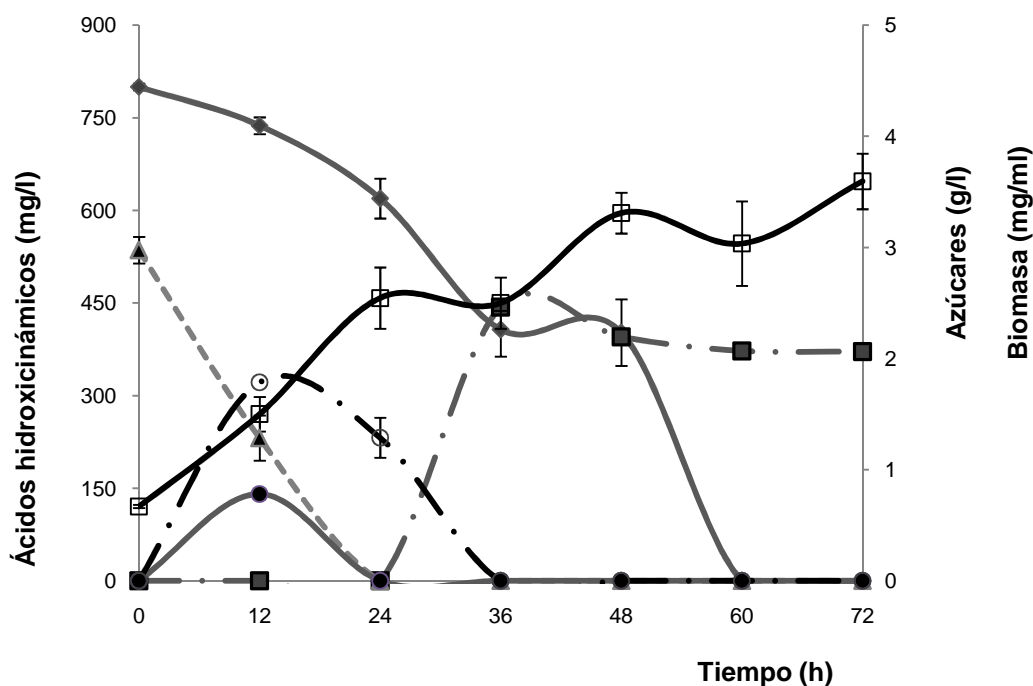


Figura 7.1 Biotransformación del ácido clorogénico por la cepa *A. niger* C23308. Ácido clorogénico (◆), ácido caféico (■), sacarosa (▲), glucosa (●), fructosa (○), biomasa ( ).

Durante las primeras 12 horas, la sacarosa presente fue hidrolizada y consumida, se estimaron alrededor de 1.28 g/l de sacarosa, 0.78 g/l de glucosa y 1.79 g/l de fructosa. En este punto el valor de biomasa presentó un incremento del doble del valor inicial, ya que se alcanzó una concentración de 1.5 mg/ml. En este momento, el ácido clorogénico sólo presentó una disminución del 7.8% y no se detectó concentración de otro metabolito. A las 24h sólo se observaron 1.29 g/l de fructosa y la biomasa alcanzó un valor de 2.55 mg/ml, mientras que la concentración del ácido clorogénico disminuyó en un 25%, lo que sugeriría que el microorganismo utiliza el compuesto fenólico como fuente de carbono, ya que en esta etapa del cultivo se mostró un incremento en la concentración de biomasa pero no en la generación de intermediarios.

A las 36 h la concentración de biomasa se mantuvo constante, posiblemente como consecuencia del consumo total de los azúcares y por el efecto inhibitorio de las altas concentraciones de los compuestos fenólicos presentes en el medio, ya que en esta etapa, la mitad del ácido clorogénico ha sido biotransformado y se detecta por primera vez durante la fermentación, el ácido caféico a una concentración de 400 mg/l. Al final de la fermentación, la concentración de ácido caféico fue de 371 mg/l, mientras que el ácido clorogénico fué totalmente consumido.

Además del ácido caféico, también se detectó un compuesto desconocido desde las 36 h y hasta las 72 h de fermentación, que fue analizado espectroscópicamente (Figura 7.2).

Al comparar el compuesto encontrado con los compuestos de referencia, se encontró que el compuesto desconocido y el ácido protocatecánico presentaron los mismos máximos de absorción de luz UV a 244, 259, 280 y 294 nm.

La descarboxilación de la cadena propenónica del ácido caféico en ácido protocatecánico ha sido reportada por Estrada *et al.*, (2003) y por Torres y Torres y Rosazza (2001), en ambos estudios la presencia de ácido protocatecánico se presentó a partir de ácido *p*-cumárico y no a partir del ácido clorogénico.



El mecanismo de descarboxilación del cafeato a protocatecoato ha sido estudiado en *Acinetobacter* sp ADP1 por Smith *et al.*, (2003), demostraron que la generación del protocatecoato puede llevarse a cabo a partir del cafeato o quinato, posterior a la hidrólisis del ácido clorogénico.

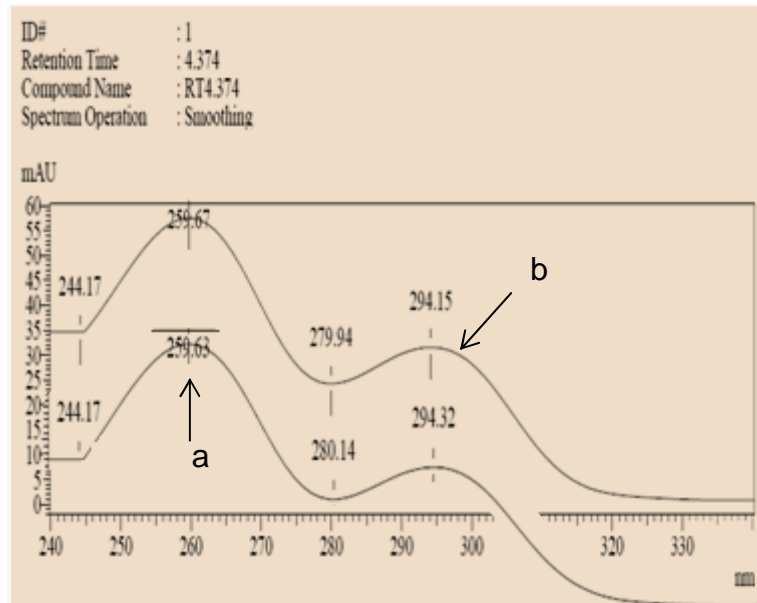


Figura 7.2. a) Espectro UV del ácido protocatecico. b) Espectro UV del compuesto desconocido producido durante la biotransformación del ácido clorogénico con la cepa *A. niger* C23308.

En el caso del género *Aspergillus*, existen diversos estudios en los que se describen el uso de la clorogenato esterasa para la producción de ácido caféico y ácido quínico. A diferencia de *Acitenobacter* sp ADP1, con las cepas de *A. niger* no se mencionan otros metabolitos formados durante este proceso, ya que los estudios se orientan a la identificación de la enzima responsable.

Los estudios previos no revelan la cantidad de ácido caféico producido, en el presente estudio *A. niger* C23308 mostró la capacidad de biotransformar el ácido clorogénico en ácido caféico, compuesto que posee una fuerte capacidad antioxidante (Castelluccio *et al.*, 1995). Desde esta perspectiva, resulta interesante la utilización de residuos agrícolas, particularmente la pulpa de café para la producción de ácido caféico, ya que se ha reportado que tiene una concentración de ácido clorogénico de 64 mg/g (Ramírez-Martínez *et al.*, 1988).

La biotransformación del ácido clorogénico por *A. niger* C23308 sugiere que esta cepa puede producir la clorogénico esterasa para formar ácido caféico a partir del ácido clorogénico, el que posteriormente puede sufrir una degradación de la cadena propenónica para formar el ácido protocatecólico (Figura 7.3).

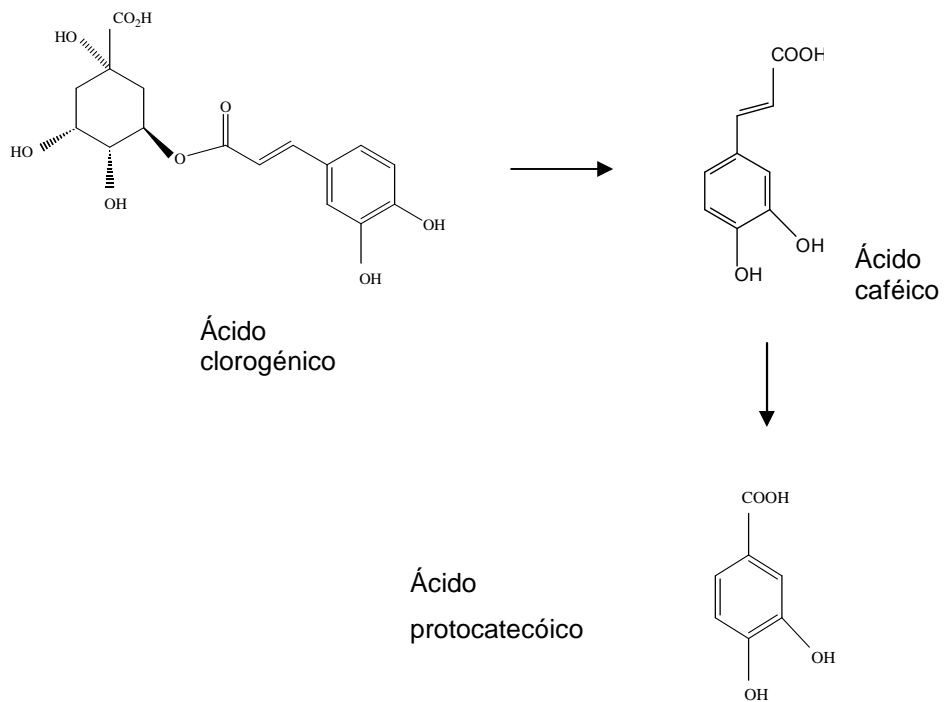


Figura 7.3 Biotransformación del ácido clorogénico en ácido caféico y ácido protocatecólico por la cepa *A. niger* C23308.

---

*CAPÍTULO 8*  
*BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO*  
*P-CUMÁRICO*

## **8. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO p-CUMÁRICO**

El ácido p-cumárico es un ácido hidroxicinámico que se encuentra de manera abundante como constituyente de la pared celular de las plantas, éste compuesto se encuentra esterificado a la lignina. Se encuentra presente en frutas y vegetales, principalmente en forma de ésteres solubles (Clifford, 2000).

El estudio de microorganismos capaces de metabolizar los ácidos hidroxicinámicos ha sido de interés para muchos investigadores. Particularmente, para la obtención de hidroxibenzoatos, los cuales presentan propiedades antioxidantes, antimicrobianas, hipoglucémicas y han sido utilizado como conservadores en la industria alimentaria y farmacéutica (Sachan *et al.*, 2006).

Considerando la importancia de los productos de la biotransformación del ácido p-cumárico (ACU), en particular los hidroxibenzoatos, se dedica este capítulo al estudio de la biotransformación del ACU con tres cepas de hongos filamentosos. El trabajo se realizó de la siguiente manera: 1) En cultivo líquido se exploró la biotransformación del ácido p-cumárico con 2 medios de cultivo, ya que se ha reportado que azúcares de fácil asimilación como la glucosa y la fructosa, son inhibidores de muchas reacciones del metabolismo secundario que es el responsable de la producción de los metabolitos esperados (Ander *et al.*, 1980; Lesage-Meesen *et al.*, 1997). Por ello, se probaron dos medios de cultivo, el medio A, con dos azúcares en su composición (maltosa y glucosa), y el medio B con una sola fuente de azúcar (sacarosa). 2) La técnica de Cromatografía preparativa (CP), se aplicó para purificar algunas fracciones de los extractos de la fermentación de *A. niger* C17309. Las fracciones fueron analizadas por GC-MS y se identificaron 4 compuestos. En una segunda etapa, se usaron los cultivos líquido y sólido. Para cada cultivo se realizaron cinéticas, se estimó el consumo de sustrato y la generación de productos, se midió el pH,

la concentración de biomasa, la concentración de amonio (sólo en el medio A) y concentración de azúcares

### 8.1 ESTUDIO PRELIMINAR DE LA BIOTRANSFORMACIÓN EN CULTIVO LÍQUIDO DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO POR LAS CEPAS *A. tamarii* V12307, *A. niger* C17309 y *A. niger* AD96-4

*A. tamarii* V12307, *A. niger* C17309 y *A. niger* AD96-4 se probaron en cultivo líquido con 800 mg/l de ácido *p*-cumárico. El análisis de los extractos se realizó a las 72 h de fermentación, se determinaron la biomasa y el pH. La degradación de sustrato y la formación de productos se analizaron con la técnica de cromatografía en capa fina. Los resultados se muestran en la Tabla 8.1

Tabla 8.1. Estudio preliminar de la biotransformación del ácido *p*-cumárico (800 mg/l), por *A. tamarii* V12307, *A. niger* C17309 y *A. niger* Ad96-4.

Cepa	Medio	Producto	Rf	Biomasa (mg/ml)	pH
<i>A. niger</i> C17309	A	Ácido caféico	0.32	1.2 ± 0.02	3.04±0.025
	B	Cx	0.79	2.6 ± 0.07	3.31±0.766
<i>A. tamarii</i> V12307	A	Ácido caféico	0.32	5.9 ± 0.02	4.29±0.076
		Cx	0.79		
<i>A. niger</i> Ad96-4	B	Ácido caféico	0.32	2.1 ± 0.02	7.39±0.060
		Cx	0.79		
	B	Cx	0.79	2.75 ± 0.08	3.04±0.302

Cx: Producto desconocido generado durante la biotransformación del ácido *p*-cumárico

La Tabla 8.1 muestra que las cepas *A. tamarii* V12307 y *A. niger* C17309 con el medio de cultivo A, biotransformaron el ácido *p*-cumárico y generaron como producto principal el ácido caféico, aunque la cepa *A. tamarii* V12307 generó mayor cantidad de biomasa y valores de pH más altos que la cepa *A. niger* C17309. Por otro lado, las mismas cepas con el medio de cultivo B, biotransformaron el ácido *p*-cumárico en un compuesto desconocido (diferente a la vía de referencia), este compuesto con un Rf de 0.79. Con este medio de cultivo, *A. niger* C17309 generó una biomasa menor y valores de pH más altos en comparación con *A. tamarii* V12307. Las diferencias en los valores de biomasa pueden estar relacionadas a la composición del medio. La diferencia entre la composición del medio de cultivo A y el medio de cultivo B mostró diferencias significativas en las concentraciones de biomasa entre un medio y otro.

Con respecto a *A. niger* Ad96-4, sólo se analizó con el medio de cultivo B, que biotransformó el ácido *p*-cumárico en un compuesto con Rf de 0.79. La formación de biomasa no presentó diferencias significativas con *A. tamarii* V12307, aunque el valores de pH fueron más cercano al cepa *A. niger* C17309.

En cuanto al compuesto generado por las tres cepas, es posible que se trate de algún hidroxibenzoato u otros productos de la reducción de la cadena propenóica del ácido *p*-cumárico, reportado en *Paecilomyces variotii* MTCC 6581 (Sachan et al., 2006); *Halomonas* sp. IMPC (Abdelkafi et al., 2006) o *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533 (Estrada et al., 2001).

Las reacciones de biotransformación estudiadas mostraron la presencia de un compuesto desconocido. Por ello se realizaron cultivos adicionales con *A. niger* C17309 en medio de cultivo B y ácido *p*-cumárico a una concentración de 800 mg/l. Los extractos fueron tratados como se describió en la sección 5.7.3 y sometidos a cromatografía preparativa identificación.

## 8.2 ANÁLISIS DEL EXTRACTO DE LA BIOTRANSFORMACIÓN EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO POR LA CEPA *A. niger* C17309.

Con cromatografía preparativa se obtuvieron dos fracciones a partir de los extractos de la cepa *A. niger* C17309 con el medio B y ácido *p*-cumárico; posteriormente, estas fracciones fueron analizadas por GC-MS. La Figura 8.1 muestra el cromatograma de ionización del extracto concentrado de la cepa *A. niger* C17309, se aprecian diferentes picos, correspondientes a los compuestos presentes en la fracción.

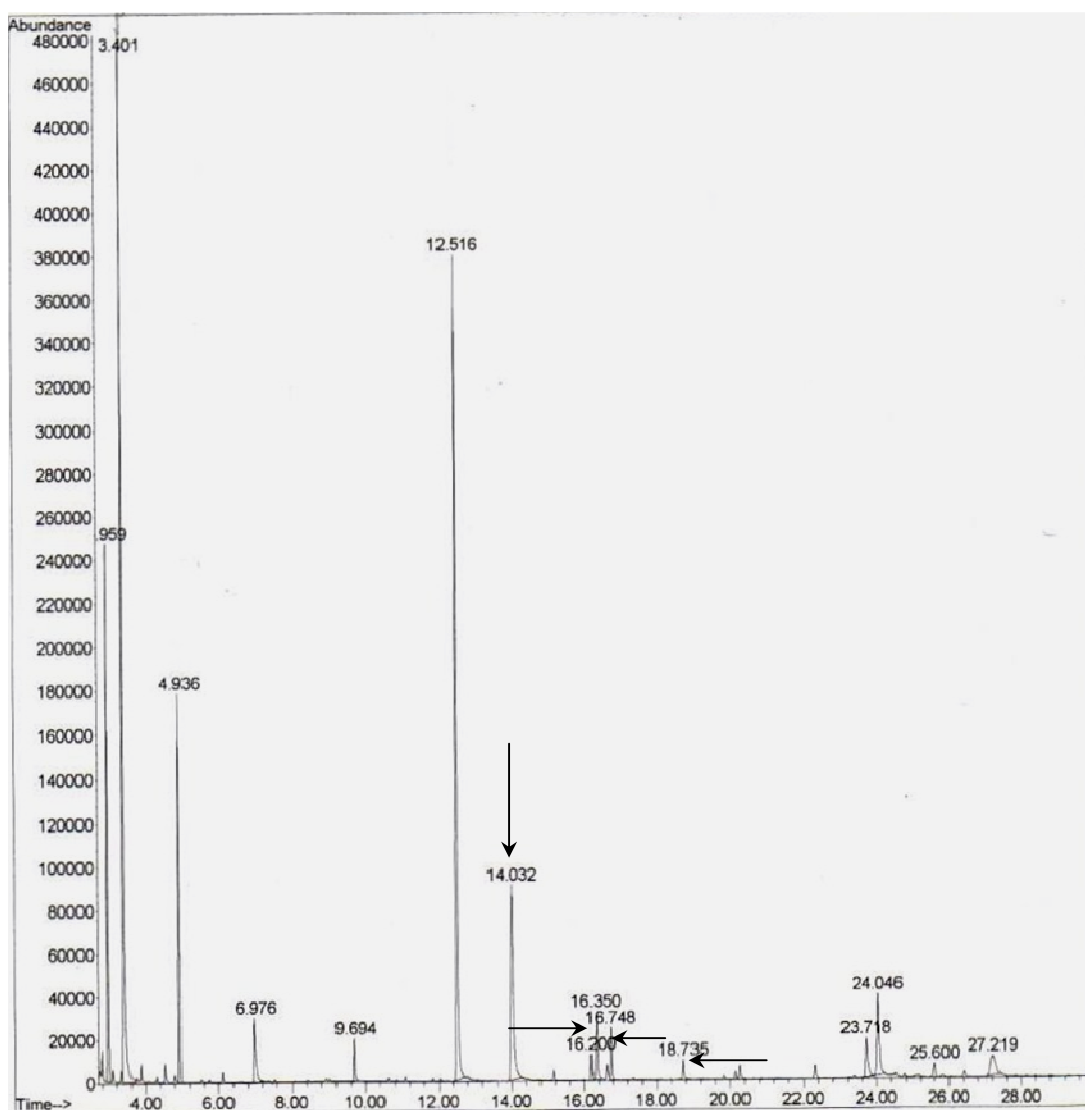


Figura 8.1. Cromatograma de ionización del extracto concentrado del cultivo de *A. niger* C17309 con medio B y ácido *p*-cumárico (800 mg/l).

En la Figura 8.1, se muestra el cromatograma de los productos obtenidos de la biotransformación el ácido *p*-cumárico con *A. niger* C17309. De acuerdo a la reacción de biotransformación, se encontraron cuatro compuestos, con tiempos de retención de 14.02, 16.35, 16.74 y 18.73 min. Los picos con los tiempos de retención de 12.5 y 4.9 min, corresponden a los solventes de la muestra. En la Tabla 8.2 y en la Figura 8.2 se muestran los resultados obtenidos del análisis por GC-MS.

Tabla 8.2. Compuestos obtenidos del análisis de GC-MS de las fracciones purificadas del extracto concentrado de *A. niger* C17309 con medio B usando ácido *p*-cumárico a 800 mg/l.

Tiempo de retención (min)	Masa	Porcentaje (%)	Nombre
14.03	110	10.6	Hidroquinona
16.35	122	2.47	4-hidroxibenzaldehido
16.74	136	0.65	4-propil fenol
18.73	152	0.54	metil 4- hidroxibenzoato

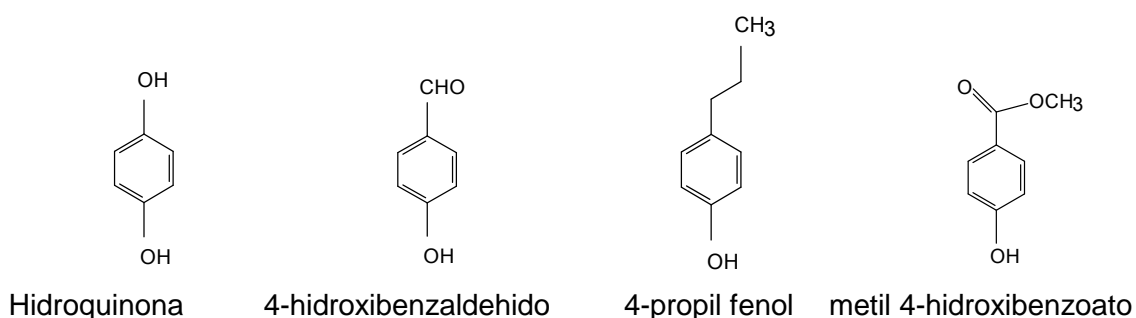


Figura 8.2 Productos de la biotransformación del ácido *p*-cumárico por *A. niger* C17309 identificados por GC-MS.

La Tabla 8.2 muestra cuatro productos de la biotransformación del ácido *p*-cumárico producidos por *A. niger* C17309. Estos compuestos se encontraron en diferentes proporciones.



La hidroquinona en un 10.6%, seguida del 4-hidroxibenzaldehído con un 2.47%, el 4-propilfenol con 0.65% y el metil 4- hidroxibenzoato con 0.54.

b

El 4-hidroxibenzaldehído ha sido reportado en la biotransformación del ácido *p*-cumárico por *Paecilomyces variotii* MTCC 6581 (Sachan *et al.*, 2006); *Halomonas* sp. IMPC (Abdelkafi *et al.*, 2006) o *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533 (Estrada *et al.*, 2001). El 4-hidroxibenzaldehído es un componente de la vaina de vainilla, es la molécula mayoritaria después de la vainillina y contribuye al aroma y sabor de la vainilla (Ranadive, 1992). En estos estudios el 4-hidroxibenzaldehído es oxidado para formar el ácido hidroxibenzóico. No se encontraron reportes del metil 4- hidroxibenzoato como producto de biotransformación del ácido *p*-cumárico, es posible que este compuesto se trate de un intermediario en la formación de ácido *p*-hidroxibenzóico.

La presencia de la hidroquinona en los extractos de *A. niger* C17309, sugieren un mecanismo similar de biotransformación del ácido *p*-cumárico por *B. megaterium* (Torres y Torres and Rosazza, 2001). La hidroquinona es un compuesto que se utiliza como revelador fotográfico, como materia prima para la elaboración de colorantes y existen estudios que evidencian la acción de la hidroquinona para el tratamiento del melasma (García and Fulton, 1996).

Algunas cepas fúngicas como *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533 (Estrada *et al.*, 2001), *Ischnoderma benzoinum* (Krings *et al.*, 1996) y *Polyporus tuberaster* (Kawabe and Morita 1994), biotransforman el ácido *p*-cumárico por la vía de reducción de la cadena propenóica, generando el ácido 3-(4-hidroxifenil)-propanoico y el 3-(4-hidroxifenil)-propanol, por lo que el 4-propilfenol podría ser el producto de la reducción del 3-(4-hidroxifenil)-propanol.

En este estudio preliminar de biotransformación se encontró que 3 de las cepas evaluadas presentaron la capacidad de biotransformar el ácido *p*-cumárico, *A. tamarii* V120307, *A. niger* C17309 y *A. niger* Ad96-4. La cepa C17309 puede ser buena candidata para producción de compuestos que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica. *A. tamarii* V120307 y

*A. niger* C17309 aparentemente siguen el mismo mecanismo. Se identificaron algunos compuestos de los extractos de *A. niger* C17309 se encontró que esta cepa genera compuestos de valor agregado como el 4-hidroxibenzaldehído, el metil-4- hidroxibenzoato, la hidroquinona y el 4-propilfenol.

### **8.3 BIOTRANSFORMACIÓN EN CULTIVO LÍQUIDO DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO POR *A. tamarii* V12307 CON MEDIO DE CULTIVO A Y B.**

En esta etapa, se realizó la cinética de la biotransformación del ácido *p*-cumárico en fermentación líquida con dos medios de cultivo (A y B). Se decidió trabajar con la cepa *A. tamarii* V12307 por ser una cepa con la capacidad de producir la enzima feruloilesterasa y la pectinasa (Pérez-Morales, 2008).

Las cinéticas de biotransformación del ácido *p*-cumárico se ensayaron con la cepa *A. tamarii* V12307, como se detalla en la sección 5.3.1. La toma de muestras se realizó a intervalos de 12 h durante 72 h. Las muestras fueron tratadas como se describe en la sección 5.7.1 y a las alícuotas se les determinó el pH, concentración de azúcares, sustrato y productos.

#### **8.3.1 BIOTRANSFORMACIÓN EN FML DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO POR LA CEPA *A. tamarii* V12307 EN EL MEDIO DE CULTIVO A**

El análisis por cromatografía en capa fina de los productos de la reacción de biotransformación del ácido *p*-cumárico con la cepa *A. tamarii* V12307 con el medio A, mostró la presencia de un compuesto desconocido, con un R<sub>f</sub> de 0.79 igual al R<sub>f</sub> del Cx, reportado en la Tabla 8.1.

El compuesto fue comparado con diversos estándares y se identificó por Espectrofotometría UV (Figura 8.3.) y comparado contra el estándar. Se encontró que ambos presentaban máximos de absorción UV a 244, 254, 310, 326 y 332 nm, lo que confirmó la presencia del ácido *p*-hidroxibenzóico en la muestra problema.

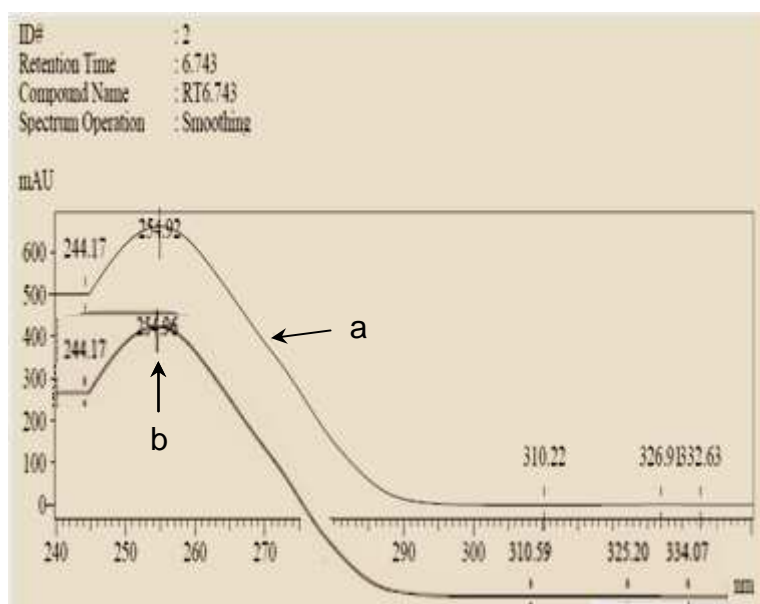


Figura 8.3 a) Espectro UV del estándar del ácido *p*- hidroxibenzóico. b) Espectro UV del compuesto encontrado durante el cultivo líquido con el medio A de *A. tamarii* V12307.

La Figura 8.4 muestra la concentración de biomasa, maltosa y glucosa, así como la evolución del pH durante la transformación del ácido *p*-cumárico por *A. tamarii* V12307 a las 72 h de cultivo. La Figura 8.5 muestra la producción de ácido caféico, de ácido protocatecúico, de ácido *p*- hidroxibenzóico.

En las primeras 12 horas, el 22% de la maltosa fue consumida (Figura 8.4), mientras que la glucosa permaneció sin variación (3 g/l). En esta etapa, alrededor del 50% del ácido *p*-cumárico había sido biotransformado y se produjeron 31 mg/l de ácido caféico y 71 mg/l de ácido *p*-hidroxibenzóico (Figura 8.5).

A las 24h, el 50% de la glucosa fue consumida, la maltosa permaneció casi constante, la concentración de biomasa alcanzó un valor de 4 mg/ml, y el pH fue de 5.4. A partir de las 36 h de fermentación se observa un incremento importante en la concentración de biomasa, posiblemente como consecuencia del consumo de la glucosa (Figura 8.4). En cuanto al ácido *p*-cumárico su concentración disminuyó en un 66% y se alcanzó la concentración máxima de

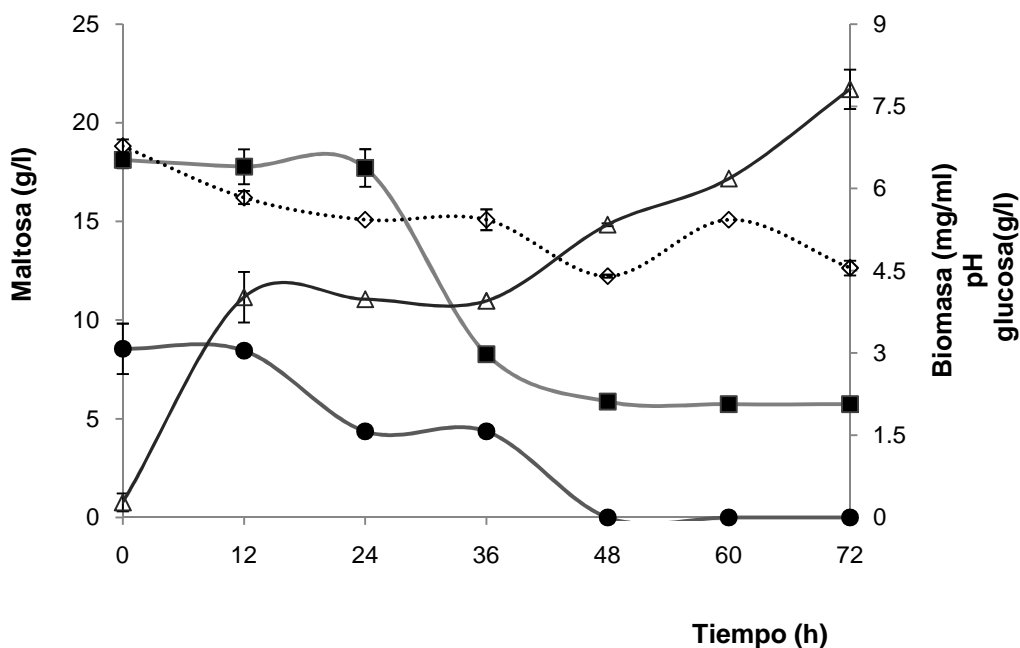


Figura 8.4. Biotransformación de ácido *p*-cumárico por *A. tamarii* V12307 en medio de cultivo A por FML. Maltosa (■), glucosa (●), biomasa (Δ), pH (◇).

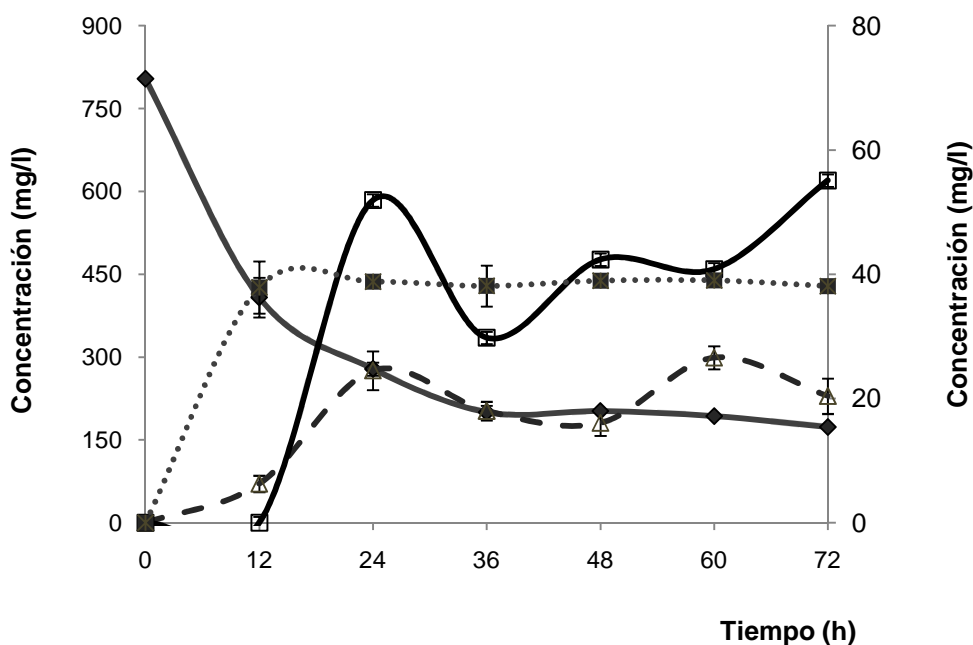


Figura 8.5. Productos de la transformación del ácido *p*-cumárico con la cepa *A. tamarii* V12307 en medio de cultivo A por FML. Ácido *p*-cumárico (◆), ácido *p*-hidroxibenzoico (Δ), ácido caféico (■), ácido protocatecico (□)

los productos de biotransformación: 51 mg/l de ácido protocatecánico de 51 mg/l, 38 mg/l de ácido caféico y 275 mg/l de ácido p-hidroxibenzóico.

Después de 24 h de cultivo, la concentración de los productos fenólicos no mostró cambios importantes. Sólo el ácido p-hidroxibenzóico mostró una disminución después de este tiempo de fermentación.

A las 72 h, el contenido de ácido p-cumárico fue de 173 mg/l. Se observó la acumulación de los productos de biotransformación. La conversión de ácido p-cumárico y los rendimientos se muestran en la Tabla 8.3. Bajo estas condiciones de cultivo, se observó una conversión del ácido p-cumárico del 78%, un rendimiento molar de formación del ácido caféico del 21%, el ácido p-hidroxibenzóico 56% y el ácido protocatecánico del 9%. Lo que sugiere la cepa sigue preferentemente la vía de la  $\beta$ -oxidación de la cadena alifática del ácido p-cumárico, para formar el ácido p-hidroxibenzóico (Torres y Torres y Rosazza, 2001), seguida de la primera adición de un grupo hidroxilo al anillo aromático para formar el ácido caféico y una segunda adición del mismo grupo para formar el ácido protocatecánico.

Tabla 8.3. Conversión y rendimiento molar de los productos de la biotransformación del ácido p-cumárico por *A. tamarii* V12307 con los medios de cultivo A y B a 72 h

Compuesto	Medio de cultivo A	Medio de cultivo B
(%)		
Ácido p-cumárico	78	90
RM		
Ácido protocatecánico	9	ND
RM		
Ácido caféico	5	24
RM		
Ácido p-hidroxibenzóico	56	2

C: Conversión molar

RM: Rendimiento molar

ND: No detectado

El pH presentó cambios importantes, al inicio de la fermentación, su valor fue 7 y después de 72h de cultivo llegó a 4.55, éste cambio en el medio se debe a la acumulación de los compuestos fenólicos en el cultivo.

A las 48 h de cultivo la glucosa fue consumida totalmente, no así la maltosa al final de la fermentación, se midieron 5.8 g/l. Este comportamiento podría deberse a que el microorganismo utiliza en un principio la glucosa y maltosa como fuente de carbono y energía, una vez consumida la glucosa, el microorganismo utiliza los compuestos fenólicos presentes en el medio como fuente de energía.

*A. tamarii* V12307 biotransformó el ácido *p*-cumárico principalmente a través de la  $\beta$ - oxidación de la cadena alifática para formar el ácido *p*-hidroxibenzóico, seguida de la hidroxilación del anillo para formar el ácido caféico y protocatecóico. La presencia de estos productos demuestra que bajo estas condiciones es posible la obtención de compuestos con alto valor agregado.

### 8.3.2 BIOTRANSFORMACIÓN EN CULTIVO LÍQUIDO DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO POR *A. tamarii* V12307 EN EL MEDIO B

Se estudió la cinética de biotransformación del ácido *p*-cumárico por *A. tamarii* V12307 en el medio B, como se detalla en la sección 5.3.1, con la toma de muestra a intervalos de 12 h durante 72 h. Las muestras fueron tratadas como se describe en la sección 5.7.1 y a las alícuotas se les determinó el pH, concentración de azúcares, sustrato y de productos.

La Figura 8.6 muestra la concentración de biomasa, maltosa y glucosa, así como la evolución del pH durante la transformación del ácido *p*-cumárico por *A. tamarii* V12307 durante 72 h de cultivo. La Figura 8.7 muestra la producción de ácido caféico, y de ácido *p*-hidroxibenzóico durante la misma fermentación.

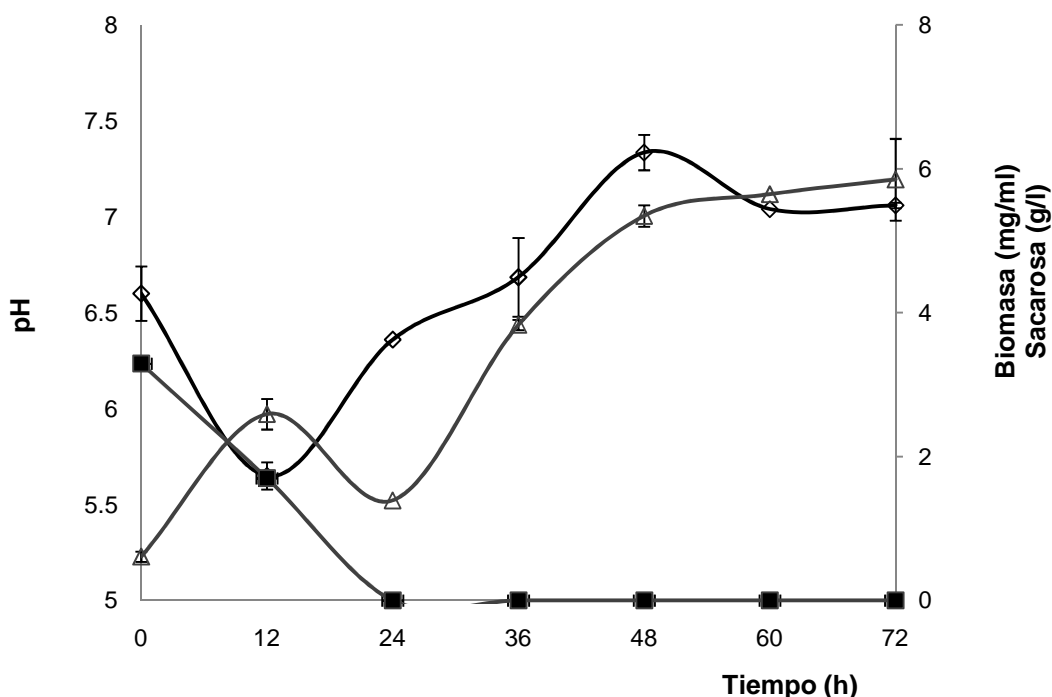


Figura 8.6. Productos de la transformación el ácido *p*-cumárico con *A. tamarii* V12307 en medio B por FML. Sacarosa (■), biomasa (Δ), pH (◇).

En la Figura 8.6 se observa que el pH no presentó variaciones importantes, el valor al inicio fue de 6.8 y al final de la fermentación fue de 7.04. Los azúcares se agotaron a las 24h de la fermentación aunque a las 12h sólo se detectaron 0.68 g/l de fructosa, producto de la hidrólisis de la sacarosa. Posteriormente, la fructosa se agotó y a las 36 h de fermentación no se detectaron azúcares

Durante las 12 primeras horas, el ácido *p*-cumárico disminuyó en un 44%, se detectaron alrededor de 146 mg/l de ácido caféico (Figura 8.7).

A las 36 h el ácido *p*-cumárico disminuyó en un 50% y se midió la mayor concentración de ácido caféico (75mg/l), mientras que para el ácido *p*-hidroxibenzóico la máxima concentración (20.1 mg/l) se determinó a las 48h.

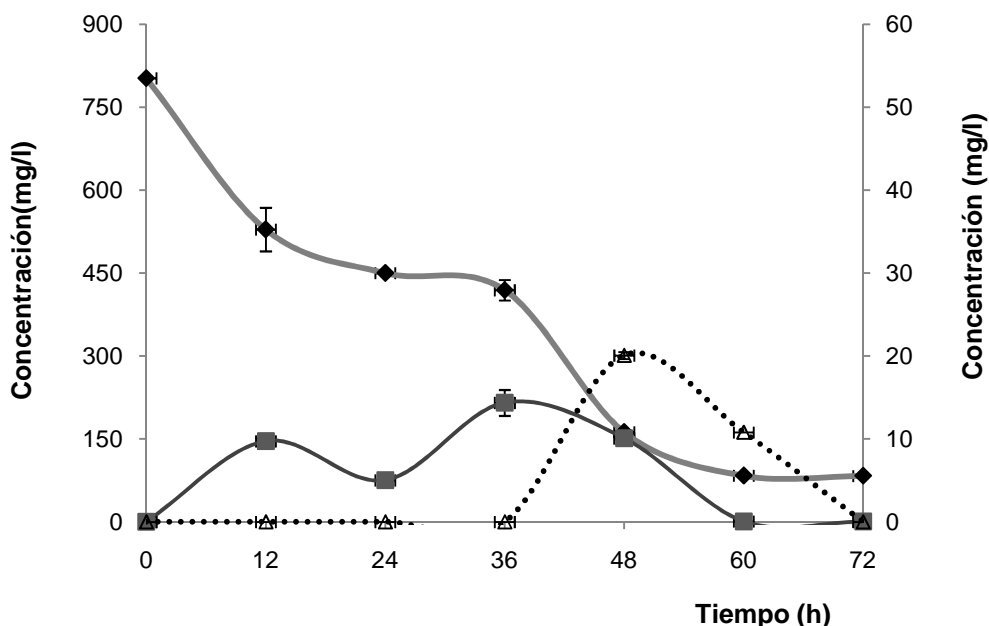


Figura 8.7. Biotransformación del ácido *p*-cumárico *A. tamarii* V12307 y medio de cultivo B por FML. En el eje de las ordenadas izquierdo, se presenta el ácido *p*-cumárico (◆), ácido caféico (■), en el eje de las ordenadas derecho, se presenta ácido *p*-hidroxibenzóico (Δ).

A las 72 h, la concentración final del ácido *p*-cumárico fue de 72 mg/l y se observó que los compuestos fenólicos no se acumularon en el medio, posiblemente porque estos compuestos sufren una posterior transformación.

Con el medio A, se detectó acumulación de ácido protocatecónico, ácido caféico y ácido *p*-hidroxibenzóico. Este efecto podría deberse a que en el medio B la concentración de azúcares es baja por lo que los mismos productos de la biotransformación podrían ser utilizados como fuente de carbono y energía.

Este fenómeno también podría estar relacionado a la diferencia de toxicidad de los productos de biotransformación, ya que para eliminar los compuestos tóxicos dentro del cultivo, estos son biotransformados. Este comportamiento también se observó en la selección de cepas, ya que a concentraciones mayores de 200 mg/l con ácido caféico, se presentó inhibición de las cepas. En



estas condiciones, se observó a las 36 h de cultivo, una conversión molar del ácido *p*-cumárico de 90%, los rendimientos molares fueron 24% para el ácido caféico, 2% para el ácido *p*-hidroxibenzóico (Tabla 8.3). Cabe mencionar que además de estos productos, se detectó otro compuesto, el cual no pudo ser identificado debido a su baja concentración.

El ácido *p*-cumárico es un compuesto fenólico que presenta efectos tóxicos en las células microbianas, inhibiendo su crecimiento. Se ha reportado que el ácido *p*-cumárico en concentraciones cercanas a 750 mg/l causa inhibición del crecimiento en *P. cinnabarinus* (Estrada-Alvarado *et al.*, 2001), por lo que sólo fue posible trabajar con una concentración máxima de 450 mg/l en los cultivos de *P. cinnabarinus*. En el presente trabajo, *A. tamaritii* V12307 fue capaz de desarrollarse a 800 mg/l de ácido *p*-cumárico.

El estudio de la biotransformación del ácido *p*-cumárico con *A. tamaritii* V12307 en medio líquido, mostraron diferentes comportamientos con los medios de cultivo A y B. El medio A favorece el crecimiento del microorganismo, ya que el valor de biomasa con el medio A fue de 7.8 mg/ml mientras que con el medio B de 5.2 mg/ml. El medio A, produce ácido *p*-hidroxibenzóico y el medio B, el ácido caféico y las conversiones fueron mayores con este medio de cultivo.

El rendimiento de ácido *p*-hidroxibenzóico con el medio A fue 28 veces mayor que con el medio B. En términos de concentración con el medio A se produjeron 300 mg/l en 60 h y con el medio B 29 mg/l en 48h. Sachan *et al.*, (2006) reportaron que *P. variotii* biotransformó el ácido *p*-cumárico 10 mM, a 37°C con una productividad de 2 mg/l h de ácido *p*-hidroxibenzóico, mientras que *A. tamaritii* V12307 con el medio A, a una concentración de 5mM se obtuvo una productividad de 5 mg/l h de ácido *p*-hidroxibenzóico, lo que muestra una productividad de 2.5 veces mayor.

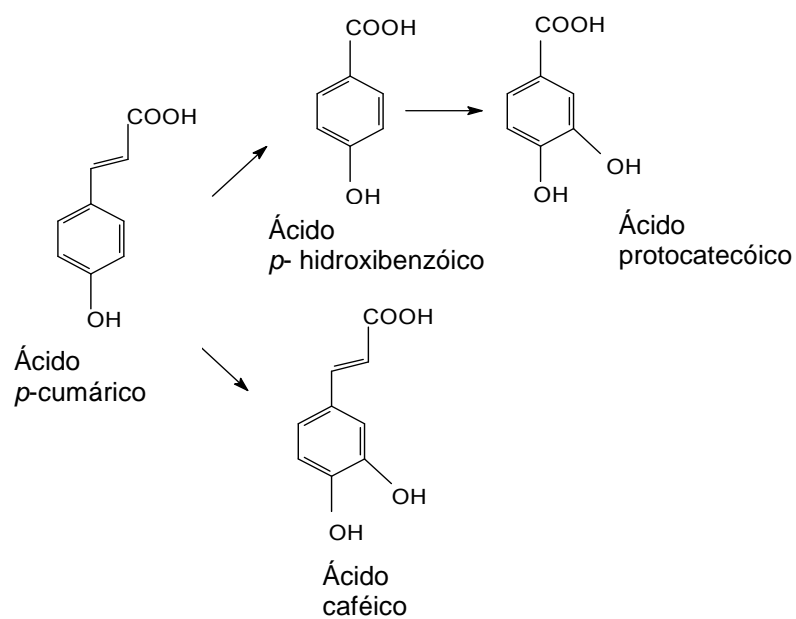
Con el medio B, se obtuvo como producto principal ácido caféico, su rendimiento molar fue de 24%, mayor al 21% que reportan Estrada *et al.*, (2003), con una concentración de glucosa de 20 g/l, mientras que en nuestro caso la concentración de sacarosa fue de 3 g/l.

La biotransformación del ácido *p*-cumárico en ácido *p*-hidroxibenzóico y ácido protocatecóico ha sido reportada en *Streptomyces setonii* (Sutherland *et al.*, 1983), *Acinetobacter calcoaceticus* (Delneri *et al.*, 1995), *Hematococcus pluvialis* (Tripathi *et al.*, 2002) *Halomonas* sp. IMPC (Abdelkafi *et al.*, 2006), y *P. variotii* (Sachan *et al.*, 2006). En estos estudios, también mencionan la presencia del *p*- hidroxibenzaldehído como producto de la biotransformación del ácido *p*-cumárico, aunque en nuestro caso no fue detectado, es posible que haya sido metabolizado (Peng *et al.*, 2003).

En el caso del medio B, se detectó un compuesto que no pudo ser identificado, el cual podría tratarse del 4-vinilfenol o incluso de algún otro compuesto, Torres y Torres y Rosazza (2001), realizaron un estudio de cepas fúngicas y bacterianas, encontraron que *A. niger* puede biotransformar el ácido *p*-cumárico en ácido caféico, 4-vinilfenol y otros compuestos desconocidos. El análisis de los productos de la biotransformación por *A. tamarii* en ambos medios de cultivo, permite establecer un posible mecanismo de biotransformación del ácido *p*-cumárico (Figura 8.7).

El estudio de la biotransformación del ácido *p*-cumárico por la cepa *A. tamarii* V12307 con dos medios de cultivo por fermentación en medio líquido, sugiere que esta cepa puede producir compuestos de alto valor agregado como son el ácido *p*-hidroxibenzóico, caféico, ácido *p*-hidroxibenzóico y el protocatecóico. Estas reacciones se dan a través de la degradación de la cadena propenóica y al nivel del anillo aromático (Figura 8.7).

MEDIO A



MEDIO B

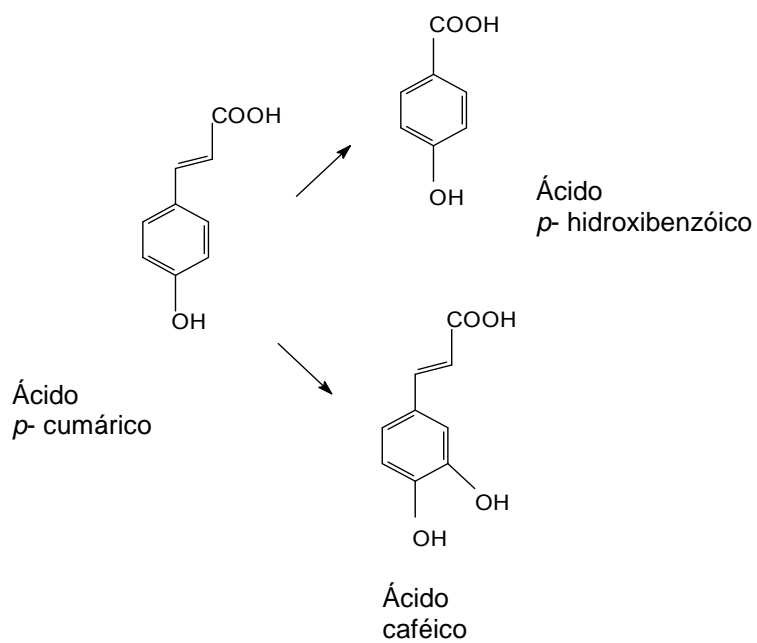


Figura 8.7. Biotransformación del ácido *p*-cumárico por la cepa *A. tamarii* V12307 con medios de cultivo A y B.

#### **8.4 BIOTRANSFORMACIÓN EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO DEL ÁCIDO *p*-CUMÁRICO POR *A. tamarii* V12307 CON MEDIO DE A y B**

El ácido *p*-cumárico se encuentra en muchos productos naturales y en subproductos agrícolas, esto hace de este hidroxicinamato un buen candidato para la producción de compuestos aromáticos de alto valor agregado. Diversos estudios reportan la biotransformación del ácido *p*-cumárico, en productos tales como el ácido *p*-hidroxibenzóico, protocatecóico, caféico, el 4-vinilfenol y el 4-etilfenol, entre otros. En este contexto, también se han identificado las hidroxilasas y descarboxilasas enzimas responsables de estas biotransformaciones (Torres y Torres and Rosazza, 2001).

Muchos de los estudios reportados de la biotransformación del ácido *p*-cumárico se han realizado en cultivo sumergido y poco se ha explorado la fermentación en medio sólido, por lo que en este apartado, se realizó el estudio de la biotransformación del ácido *p*-cumárico por la cepa *A. tamarii* V12307 en medio sólido, utilizando los medios de cultivo, A y B.

A los extractos obtenidos de la fermentación en medio sólido, se les determinó Aw, humedad, pH, se midió la concentración de ácido *p*-cumárico y se estimaron los parámetros cinéticos de la fermentación. En esta sección, los valores de los compuestos y el ácido *p*-cumárico, se muestran en términos de área para fines comparativos, debido a la gran cantidad de metabolitos encontrados y que no pudieron ser identificados.

En la Figura 8.8, se muestran los perfiles de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de la cepa *A. tamarii* V12307 con los dos medios de cultivo

En la Figura 8.8 se observa que con el medio A, el perfil de evolución del CO<sub>2</sub> alcanza dos tasas máximas. Se obtuvo una tasa CO<sub>2</sub> de 0.6 mg h<sup>-1</sup> g MSI a las 5 h de cultivo y la otra tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> de 1.05 mg h<sup>-1</sup> g MSI a las 10 horas de cultivo. Este comportamiento puede explicarse debido a la presencia de las dos fuentes de carbono, glucosa y maltosa, por lo que el

primer máximo podría estar asociado a un consumo de la glucosa y el segundo consumo de la maltosa.

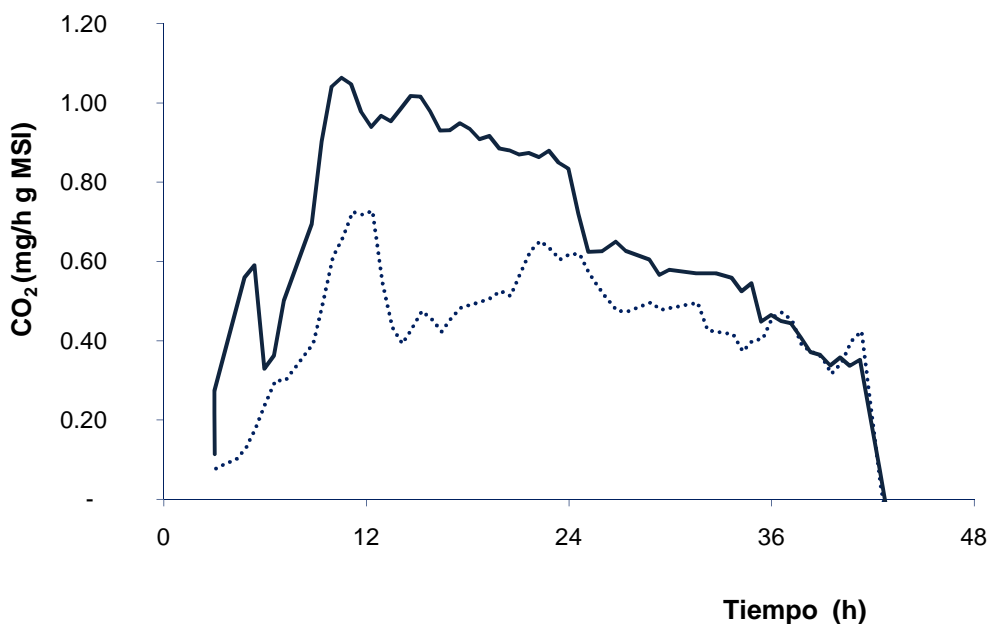


Figura 8.8. Evolución de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de la fermentación en medio sólido de *A. tamarii* V12307 con ácido *p*-cumárico en medio de cultivo A y B. Medio A (—), Medio B (.....).

El cultivo con el medio B alcanzó una tasa máxima de 0.73 mg h<sup>-1</sup> g MSI a las 12.4 horas de cultivo. Los perfiles de las tasas de producción de CO<sub>2</sub>, muestran diferencias importantes, ya que aparentemente cuando se utiliza una fuente de azúcar de rápida asimilación como es la glucosa, se acelera la tasa de crecimiento, esto se ve reflejado en que en menor tiempo se alcanza un primer máximo de producción de CO<sub>2</sub>. Por el contrario, el medio con sacarosa la producción de CO<sub>2</sub> es menor y requiere mayor tiempo. A pesar de las diferencias en la producción de CO<sub>2</sub>, se puede observar que ambos cultivos presentan perfiles semejantes, una primera etapa, asociada al crecimiento del microorganismo, una segunda etapa donde se presenta la desaceleración de la tasa de formación de CO<sub>2</sub> y la etapa en la que se produce CO<sub>2</sub> pero sólo como mantenimiento del microorganismo.

A partir de los datos de CO<sub>2</sub>, se estimaron los parámetros cinéticos de la biotransformación del ácido *p*-cumárico por la cepa *A. tamarii* V12307 con los dos medios de cultivo. Los resultados se muestran en la Tabla 8.4.

Tabla 8.4. Parámetros cinéticos de la fermentación en medio sólido del ácido *p*-cumárico por la cepa *A. tamarii* V12307 con los medios de cultivo A y B.

	Duración fase lag (h)	μ <sub>CO<sub>2</sub></sub> h <sup>-1</sup>	Tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> mg/g MSI*h
Medio A	9	0.13	1.05
Medio B	8	0.16	0.73

En la Tabla 8.4 se puede apreciar que con el medio A, la cepa presenta una mayor duración en la fase lag; la tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> es mayor en medio A, sin embargo la tasa específica de crecimiento asociada a la producción de CO<sub>2</sub> es mayor en el medio B.

El ácido *p*-cumárico fue totalmente transformado en el medio A, en cambio, con el medio B, hay una pequeña concentración residual, cerca del 10% del ácido *p*-cumárico en el medio (Tabla 8.5).

Tabla 8.5. Valores de concentración y pH de la fermentación en medio sólido del ácido *p*-cumárico por *A. tamarii* V12307 con los medios A y B.

	Ácido <i>p</i> -cumárico (mg/l)		pH	
	Inicial	Final	Inicial	Final
Medio A	811.7 ± 21.5	0	6.6 ± 0.03	5.47 ± 0.37
Medio B	802.7 ± 13.4	83.20 ± 8.9	6.6 ± 0.04	7.47 ± 0.32

En cuanto al pH, en ambos medios se observaron cambios, aunque sólo con el medio de cultivo A el valor descendió hasta 5.47 (Tabla 8.5).

En el análisis por HPLC de los productos de la fermentación en medio sólido con el medio A, sólo se encontró un producto principal con tiempo de retención de 2.59 min, compuesto que no pudo ser identificado.

Al comparar los productos obtenidos de la biotransformación con ambos medios, con el medio B se observa una conversión alta, la diversidad de productos es mucho mayor que en el medio A (Figura 8.9).

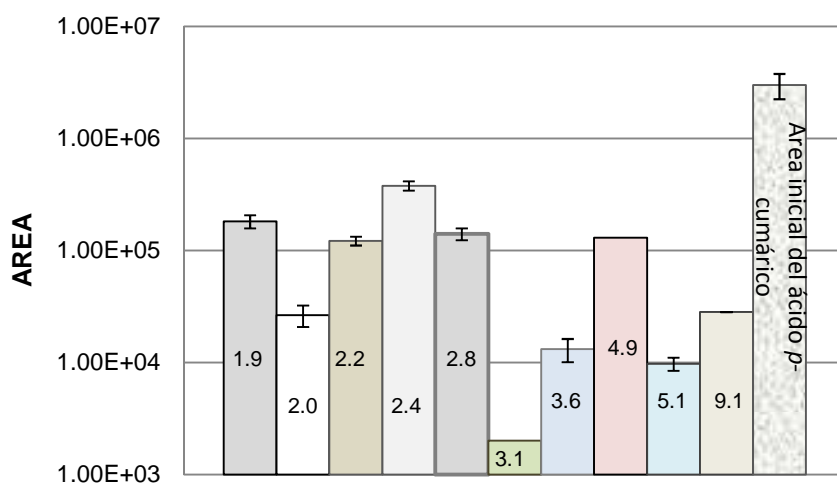


Figura 8.9. Productos de la biotransformación en medio sólido del ácido *p*-cumárico por *A. tamarii* V12307 con el medio B

Los espectros UV de cada uno de los compuestos obtenidos fue comparado con los compuestos de referencia y no se encontró coincidencia alguna, por lo que se puede confirmar que son compuestos diferentes a los que se han reportado en la biotransformación del ácido *p*-cumárico por fermentación en medio líquido, entre los cuales encontramos el ácido *p*-hidroxibenzoico, el *p*-hidroxibenzaldehído, el ácido caféico y el ácido protocatecico. Es posible que entre los productos no identificados en la biotransformación del ácido

*p*-cumárico en fermentación sólida con el medio B, se pueda encontrar 4-vinil derivados y 4-etil derivados (Cavin *et al.*, 1997b).

Los estudios de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos han sido reportados principalmente a partir del ácido ferúlico. En el caso del ácido *p*-cumárico ha sido diferente, se ha reportado que *Clostridium aerotolerans* DSM5434, y *Clostridium xylanolyticum* DSM 6555 reducen la cadena propenóica del ácido al correspondiente residuo propiónico, sin embargo, la ruta catabólica de estos ácidos fenilpropionicos no ha sido elucidada (Peng *et al.*, 2003). Los estudios han sido realizados principalmente en medio sumergido y no hay información de los productos obtenidos en cultivo en medio sólido. En el presente estudio se obtuvieron diferentes compuestos, sin embargo, la gran diversidad y baja concentración en el medio no permitió su identificación.

Es necesario explorar más a fondo la biotransformación del ácido *p*-cumárico en medio sólido para poder identificar los productos generados.

Las cepas fúngicas usadas en este estudio en fermentación líquida presentaron diferentes capacidades para biotransformar el ácido *p*-cumárico en compuestos de alto valor agregado. En cultivo líquido *A. niger* C17309 biotransformó el ACU en intermediarios de los hidroxibenzoatos, mientras que la cepa *A. tamarii* V12307 biotransformó el ácido *p*-cumárico en ácido caféico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatecóiico y caféico. Mientras que en cultivo sólido con el medio de cultivo A, el ácido *p*-cumárico es transformado en sólo un compuesto y con el medio B en 10 compuestos.



---

*CAPÍTULO 9*

*BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO  
FERÚLICO*

## **9. BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO**

El 4-vinilguayacol (4VG) es un compuesto derivado del ácido ferúlico que tiene un costo 40 veces mayor. El 4VG posee un fuerte olor a clavo y es un componente importante en la elaboración de las cervezas Belgian y German Rauch. El 4VG también se utiliza para la elaboración de vinos, salsa de soya, en la industria de perfumes y para la producción de acetovainillina y etilguayacol (Mathew *et al.*, 2007) e incluso es utilizado para la preparación de soluciones oftálmicas con aroma (US Patent 20060292188).

Para el estudio de la biotransformación del ácido ferúlico (AF), se utilizó la cepa *A. niger* DAR2 por su capacidad de producir 4VG.

La cepa *A. niger* DAR2 es una cepa diploide obtenida por recombinación parasexual a partir de las cepas superproductoras de enzimas, las cepas Aw96-3 y Aw96-4, las cuales a su vez fueron aisladas de la cepa silvestre *A. niger* C28B25 (Montiel-González *et al.*, 2002). Por ello también fue incluida en este estudio la cepa *A. niger* C28B25. En este capítulo se presenta, la identificación del 4-vinilguayacol por RMN, GC-MS y HPLC. Los estudios de biotransformación del ácido ferúlico usando dos medios de cultivo (A y B) y dos cepas, la cepa *A. niger* C28B25 y la cepa *A. niger* DAR2. En sistema de cultivo líquido y cultivo sólido.

Finalmente, se caracterizó parcialmente la descarboxilasa que interviene en la transformación del ácido ferúlico en 4VG en la cepa *A. niger* DAR2 del cultivo líquido.

### **9.1 IDENTIFICACIÓN DEL 4-VINILGUAYACOL**

En el capítulo 6 de selección de cepas se encontró que *A. niger* DAR 2 generó ácido vainillínico (AV) y un compuesto desconocido a partir de ácido ferúlico. El análisis de la cromatografía en capa fina del extracto del cultivo de la cepa diploide DAR 2 mostró un compuesto con un Rf de 0.95, este extracto fue analizado por HPLC y el compuesto presentó un tiempo de retención de 25.23 min. Por cromatografía preparativa del extracto concentrado se detectaron tres

manchas con valores de Rf de 0.125, 0.51 y 0.95, los valores corresponden al AF (0.125) y AV (0.51), el último compuesto fué posteriormente identificado como 4VG por  $^1\text{H-RMN}$  (Figura 9.1),  $^{13}\text{C-RMN}$  (Figura 9.2) y GC-MS (Figura 9.3 y 9.4).

El espectro de protón de resonancia magnética de protón muestra para los protones aromáticos muestran un sistema ABX, este sistema es característico de los anillos tri-sustituidos en la posición 1, 2, 4 entre 6.93 y 6.80 ppm, los cuales corresponden a  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_e$  y  $\text{H}_f$ . A 6.63 ppm se observó un doble de dobles que integran para un protón ( $\text{H}_c$ ) con una constante cis-trans de  $J_{c-b}=10.8$  y  $J_{c-a}=17.6$  Hz.

Los protones vinílicos muestran un patrón característico de doble de dobles a 5.58 que corresponden a  $\text{H}_a$ , con constante de acoplamiento *gem-trans* de  $J_{a-b}=0.9$ ,  $J_{a-c}=17.6$  Hz; otro doble de dobles que integra para un protón se observó a 5.12, el cual también integra para un protón y presenta una constante de acoplamiento de *gem-cis*  $J_{b-a}=0.9$  y  $J_{b-c}=10.8$  Hz. Finalmente, se observó un singulete en 3.90 que integra para tres protones que corresponden al grupo  $\text{OCH}_3$ .

El espectro de  $\text{C}^{13}$  mostró nueve señales correspondientes a los carbonos presentes en la molécula. La cual presenta tres carbonos cuaternarios (146.57, 145.63, 130.27 ppm), tres uniones C-H en la zona de aromáticos (120.05, 114.34, 107.99 ppm), dos carbonos vinílicos (136.62, 111.44 ppm) y un carbono del grupo metoxilo a 55.66 ppm.

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  (ppm) 6.93 (d, 1H,  $J=1.9$  Hz, H<sub>e</sub>), 6.91 (ddd, 1H,  $J_1=0.5$ ,  $J_2=1.9$ ,  $J_3=8.0$  Hz, H<sub>d</sub>), 6.86 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, H<sub>e</sub>), 6.63 (dd, 1H  $J_1=10.8$ ,  $J_2=17.6$  Hz, H<sub>c</sub>), 5.67 (br s, 1H, OH), 5.58 (dd, 1H  $J_1=0.9$ ,  $J_2=17.5$  Hz, H<sub>a</sub>), 5.12 (dd, 1H,  $J_1=0.9$ ,  $J_2=10.8$  Hz, H<sub>b</sub>), 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>).

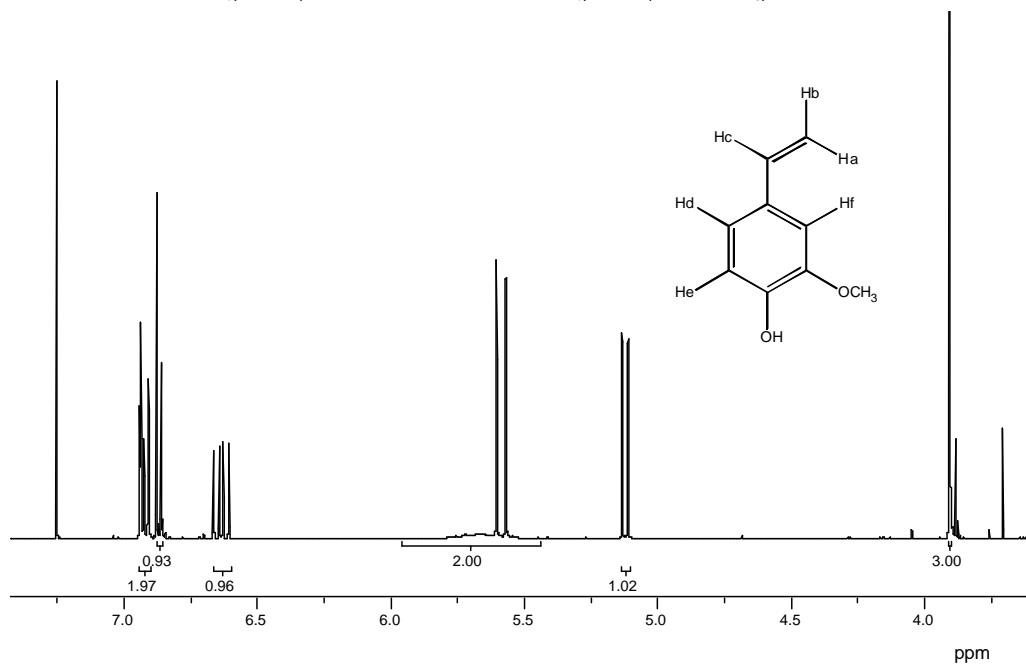


Figura 9.1. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del 4VG.

$^{13}\text{C-RMN}$  (Fig. 9.2)  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  (ppm): 146.57 (C-3-Ar), 145.63 (C-4-Ar), 136.62 (C-7), 130.27 (C-1), 120.05 (C-6), 114.34 (C-5), 111.44 (C-8), 107.99 (C-2), 55.56 (C-9).

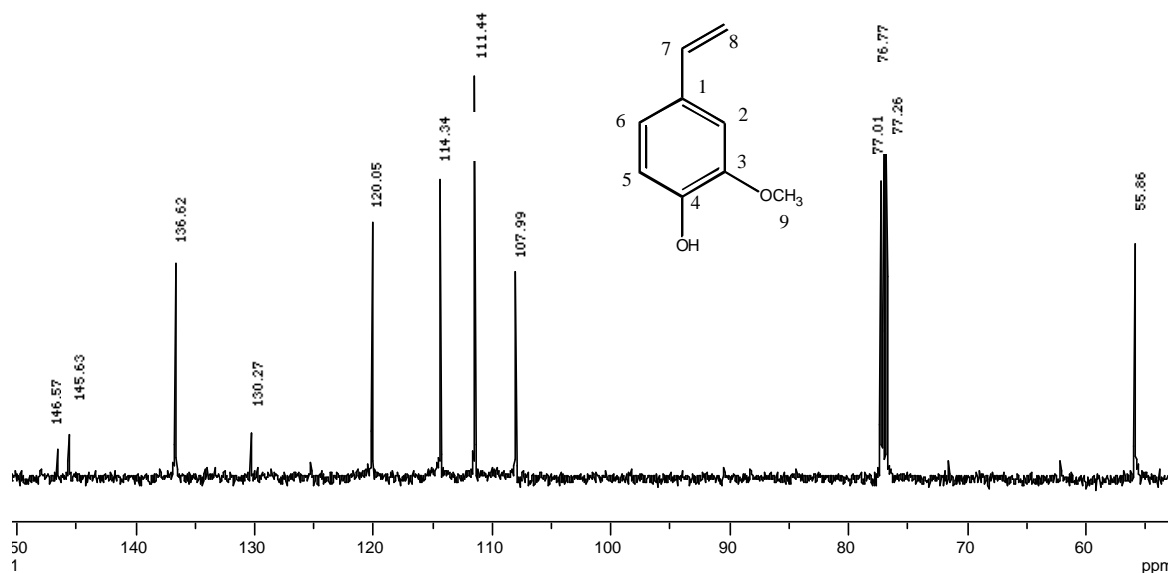


Figura 9.2.  $^{13}\text{C-NMR}$  Espectro del 4VG.

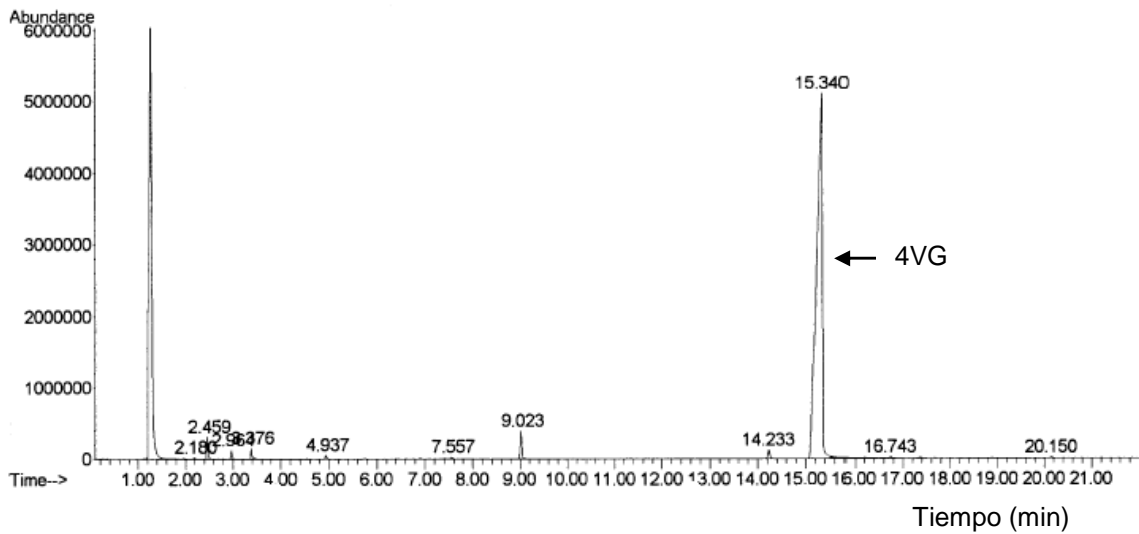


Figura 9.3. Cromatograma de ionización del extracto concentrado del cultivo de *A. niger* DAR 2 I

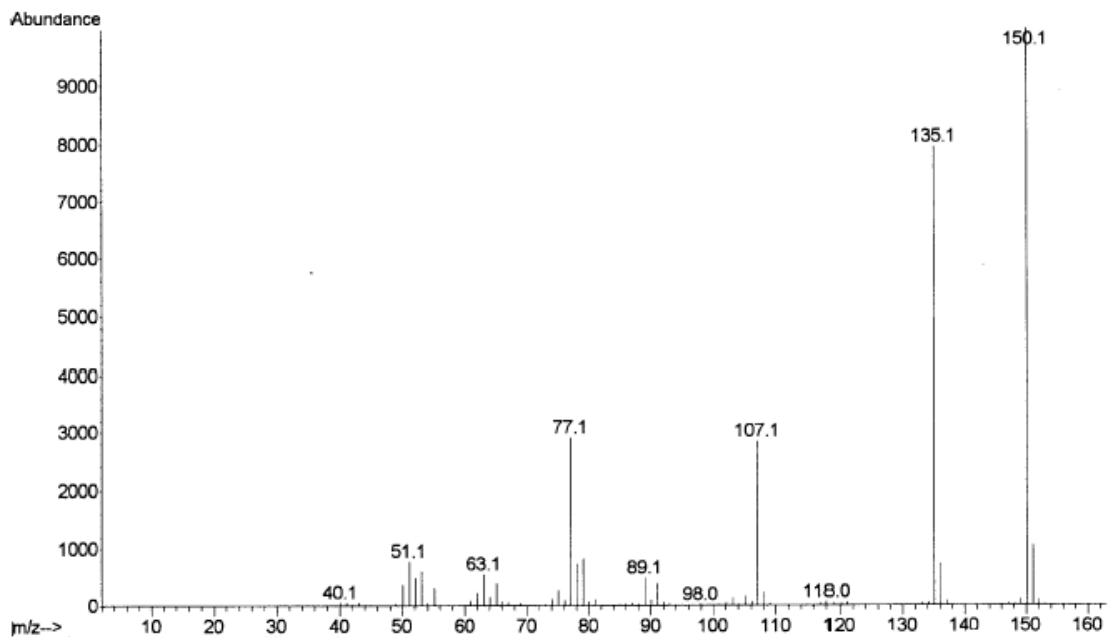


Figura 9.4. Espectro de masa del 4VG

El cromatograma del análisis por ionización del extracto concentrado, mostró un compuesto que eluyó a los 15.34 min (Figura 9.3). El espectro de masa de este compuesto (Figura 9.4), mostró los siguientes picos de iones moleculares (m/z): 150 ( $M^+$ ), 135 ( $M^+ - CH_3$ ), 107 ( $M^+ - CH_3$  y  $CH_2 = CH_2$ ) y 77.

El análisis espectroscópico del compuesto resultante de la biotransformación del AF por *A. niger* DAR2 demostró que este compuesto sufre una descarboxilación al nivel de la cadena con la correspondiente pérdida de CO<sub>2</sub>, llevando así a la formación del 4VG (Figura 9.4) y el análisis de los fragmentos por espectrometría de masas muestra fragmentos similares a los encontrados en extractos de *Rhodotorula* (Huang *et al.*, 1993; Koseki *et al.*, 1996).

## **9.2 BIOTRANSFORMACIÓN EN FERMENTACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO DEL ÁCIDO FERÚLICO POR LA CEPA SILVESTRE *A. niger* C28B25 Y LA CEPA RECOMBINANTE *A. niger* DAR2 EN MEDIOS DE CULTIVO A y B.**

La biotransformación del AF se llevó a cabo con ambas cepas, en las condiciones detalladas en la sección 5.3.1. La toma de muestras se realizó a intervalos de 12 h durante 72 h. Las muestras fueron tratadas como se describe en la sección 5.9.1 y en las alícuotas se determinó el pH, concentración de azúcares, amonio, sustrato y productos.

Los valores de pH durante la fermentación con el medio A disminuyeron de de 6.6 a 2.7 y de 6.6 a 3.1 al final del cultivo, con la cepa silvestre y recombinante, respectivamente. Mientras que en los cultivos con medio B, el pH va de 6.6 a 7.2 y de 6.6 a 7 al final del cultivo, para las mismas cepas.

A las 60h de cultivo con medio A, se observó que la maltosa fue totalmente consumida por la cepa silvestre, mientras que la glucosa permaneció presente hasta las 108 h de fermentación. Con la cepa recombinante, la maltosa fue totalmente consumida a las 84 h y la glucosa a las 108 h (Figura 9.5).

Para el caso de los cultivos con medio B, dada la rapidez del cultivo y la baja concentración de sacarosa en el medio sólo fue posible medir su concentración a 0 y 24h y se determinó que los azúcares fueron totalmente consumidos por ambas cepas a las 24 h.

Después de 120h de cultivo, el consumo de tartrato de amonio en el medio A, fue del 33% por ambas cepas.

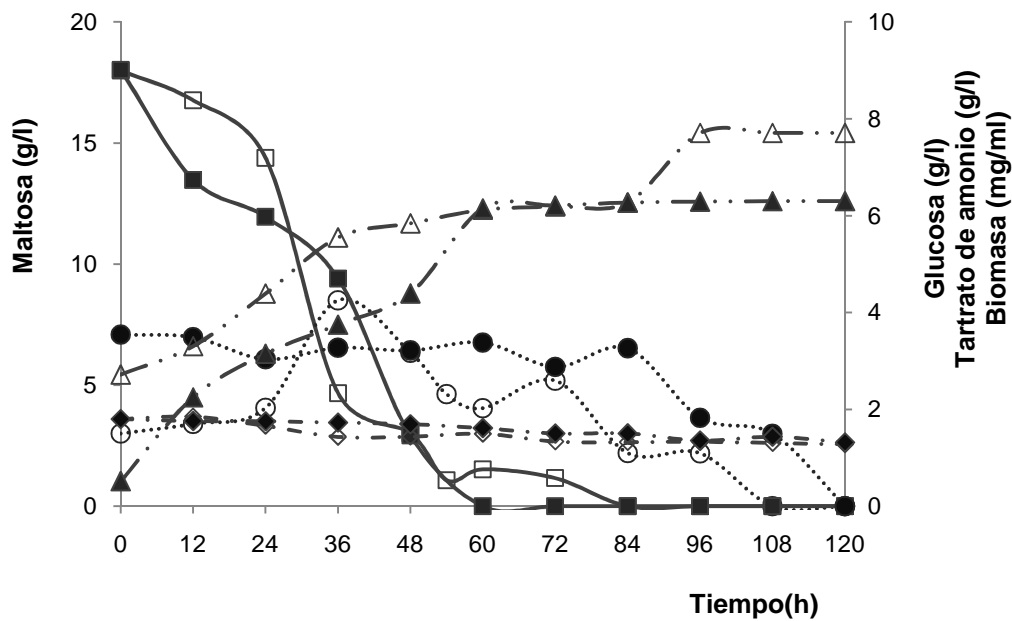


Figura 9.5. Cultivo para la transformación el ácido ferúlico con *A. niger* DAR 2 y *A. niger* C28B25 en medio de cultivo A por FML. Maltosa (□■), glucosa (○●), biomasa (Δ▲), tartrato de amonio (◇◆). Los símbolos vacíos son para *A. niger* C28B25 y los llenos para *A. niger* DAR 2.

La formación de biomasa en el medio A fue mayor con *A. niger* C28B25 (7.7 mg/ml), en comparación con *A. niger* DAR 2 (6.3 mg/ml), mientras que los valores de biomasa en cultivos con el medio B fue mayor en *A. niger* DAR 2 (4.5 mg/ml) en comparación con *A. niger* C28B25 (3.5 mg/ml). Este resultado sugiere que bajo las condiciones establecidas *A. niger* DAR 2 presentó una mayor tolerancia a la toxicidad del AF (Tsioulpasa *et al.*, 2002). Otra posible explicación a considerar es el contenido del extracto de levadura en el medio B (3g/l), el cual podría ser incorporado a biomasa y así incrementar de manera importante su concentración.

Se observa que con ambos medios de cultivo la cepa diploide DAR 2 presentó una concentración de biomasa similar al final de la fermentación. *A. niger* C28B25 presentó una biomasa mayor en los cultivos con el medio A, el cual tiene dos azúcares, maltosa y glucosa.

La Figura 9.5, muestra los perfiles de biomasa, maltosa, glucosa y tartrato de amonio para *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR2 con el medio A y ácido ferúlico durante la fermentación.

Las Figuras 9.6 y 9.7, muestra la biotransformación del ácido ferúlico en ácido vainillínico y 4-vinilguayacol con *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 con los medios de cultivo A y B. La Tabla 9.1 muestra la conversión y el rendimiento molar obtenidos después de 5 días de cultivo.

La conversión del ácido ferúlico con el medio de cultivo A por *A. niger* C28B25 fue de 67% (Tabla 9.1), con una concentración de 32 mg/l de ácido vainillínico a las 60 h de cultivo, que se tradujo en un rendimiento molar del 22% (Figura 9.5); además se detectaron pequeñas concentraciones de alcohol vainillílico (15mg/l). Con el medio de cultivo B, se observó una conversión del ácido ferúlico del 36%, con una producción de ácido vainillínico de 137 mg/l a las 24 h de cultivo (Figura 9.5), alcanzando un RM de 57%. La conversión es más alta en el medio A, pero el rendimiento de ácido vainillínico muestra que su formación se ve beneficiada con el medio de cultivo B. En términos de productividad, Ghosh *et al.*, (2006), utilizaron *Paecilomyces variotii* MTCC 6581 y después de 16 días de cultivo, obtuvieron alrededor de 137 mg/l de ácido vainillínico. La productividad (mg/l d) fue 3 veces mayor en este estudio con la cepa silvestre C28B25 que la reportada para *Paecilomyces variotii* MTCC 6581

*A. niger* DAR2 disminuyó gradualmente el AF en el medio de cultivo A y la concentración de 4VG fue detectada a partir de las 24 h de fermentación (Figura 9.5). Después de 108 h de fermentación, sólo se encontró el 35% del AF y las concentraciones de AV y 4VG fueron 67 mg/l y 48mg/l, respectivamente. En esta etapa de la fermentación los RM para el 4VG y AV fueron 22% y 15%, respectivamente, mientras que la conversión del AF fue de 66%. Por otro lado, con el medio de cultivo B, se observó que durante las 36 primeras horas de fermentación, la cepa DAR 2 solo había consumido el 8.2% del AF, en esta etapa se encontraron 21 mg/l de 4VG y 45 mg/l de AV. Después de 48 h, el AF mostró una disminución importante y un incremento en la concentración de 4VG. Luego de 72 h de fermentación, sólo se detectó el



35% del AF y las concentraciones de AV y 4VG fueron 59 mg/l y 149 mg/l, respectivamente. En esta etapa de la fermentación los RM para el 4VG y AV fueron 57% y 13%, respectivamente.

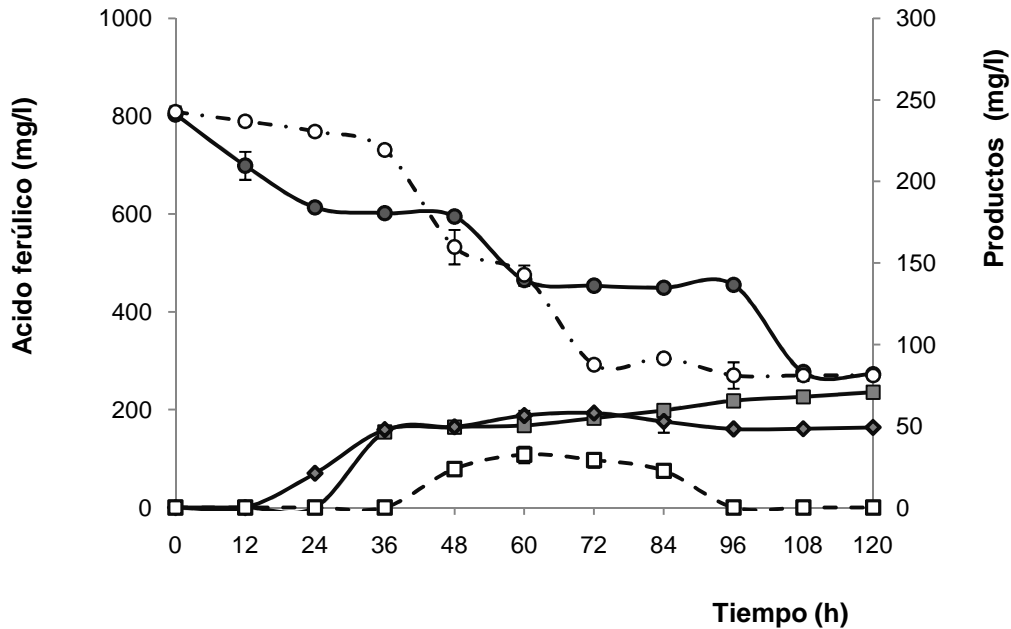


Figura 9.6. Producción de AV y 4VG durante la biotransformación del AF por las cepas fúngicas *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR2 en FML con medio de cultivo A. AF (○●), AV (□■), 4VG (◇). Los símbolos vacíos son para *A. niger* C28B25 y los llenos para *A. niger* DAR 2.

Tabla 9.1. Conversión y rendimiento molar de los productos de la biotransformación de ácido ferúlico por *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR2 en medio líquido con el medio A y B.

	Cepas		Cepas	
	C28B25	DAR 2	C28B25	DAR 2
	Medio A		Medio B	
Conversión AF (%)	67	66	36	64
RM 4VG/AF (M/M)	ND	14	ND	57
RM AV/AF (M/M)	22	15	57	13

ND: No detectado

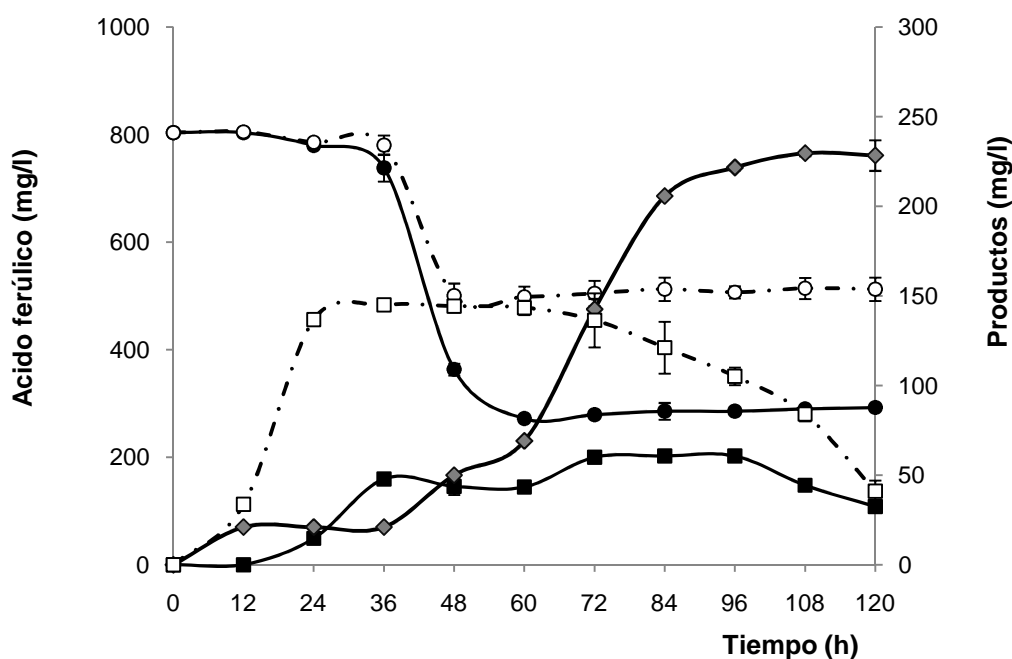


Figura 9.7. Producción de AV y 4VG durante la biotransformación del AF por las cepas fúngicas *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 en FML con medio de cultivo B. AF (○●), AV (□■), (◆) 4VG. Los símbolos vacíos son para *A. niger* C28B25 y los llenos para *A. niger* DAR 2.

En los extractos de *A. niger* DAR2 con el medio de cultivo B, se detectaron 15 mg/ml de alcohol vainillílico, metoxihidroquinona, así como otros productos en pequeñas concentraciones que no fueron identificados.

El 4VG incrementa su concentración (205 mg/l) a las 84 h de cultivo y al final es de 229 mg/l.

En la biotransformación del AF se observaron patrones diferentes en las dos cepas. *A. niger* DAR 2 produce 4VG, AV, alcohol vainillílico y metoxihidroquinona y *A. niger* C28B25 sólo produce ácido vainillínico.

En la Tabla 9.1, se puede observar que la conversión molar del ácido ferúlico es similar en ambos medios (64% y 66%). Sin embargo se observan diferencias en los rendimientos de los productos formados en ambos medios. El rendimiento de formación de AV es de 15% y de 14% para 4VG.

Es decir, *A. niger* DAR 2 forma preferencialmente el 4VG en el medio B mientras que en el medio A los rendimientos de 4VG y AV son similares.

En el caso de *A. niger* C28B25 el rendimiento del medio es de 67%, casi el doble que en el medio B. *A. niger* C28B25 en ningún caso forma 4VG. El rendimiento de 4VG es de 57%, 2.6 veces más en medio B que en el medio A. Los metabolitos encontrados han sido previamente reportados por Oddou *et al.*, (1999).

La biotransformación del AF por la cepa diploide, sugiere una descarboxilación no oxidativa a 4 VG, el cual posteriormente es reducido a alcohol vainillílico y metoxihidroquinona, semejante a la ruta que siguen *Pestalotia palmarum* (Rahouti *et al.*, 1989; Priefert *et al.*, 2001). La descarboxilación del ácido ferúlico puede ser parte del sistema de detoxificación del microorganismo, para mantener el nivel de compuestos inhibitorios bajo el umbral de concentración. Un mecanismo similar se ha observado en el metabolismo secundario, particularmente en la vía del ácido fenilpropenóico (Seshime *et al.*, 2005).

No se detectó vainillina en los cultivos, debido a que este compuesto se encuentre en bajas concentraciones y haya sido rápidamente metabolizado (Karmakar *et al.*, 2000). La biotransformación del AF con la cepa silvestre sugiere una degradación de la cadena propenóica en AV que posteriormente sufre una descarboxilación no oxidativa para originar la metoxihidroquinona, como ha sido reportada en *A. niger* I 1472 (Lesage-Meessen *et al.*, 1996).

La desregulación en la producción de enzimas ha sido reportada en la cepa diploide DAR 2, esta cepa produjo una mayor cantidad de invertasa y en menor tiempo en comparación con la cepa silvestre C28B25 (Montiel-González *et al.*, 2002). De hecho, la cepa diploide mostró variación en las proteínas que regulan varias enzimas hidrolíticas (Loera y Córdova, 2003; Montiel-González *et al.*, 2002). La regulación diferencial de las enzimas que participan en la biotransformación del AF podría explicar la acumulación del 4VG por la cepa diploide, lo que podría ser ventajoso para su producción.

La biotransformación de compuestos fenólicos ha sido reportada por Ward *et al.*, (2006), sin embargo los estudios de la descarboxilación del AF en 4VG por cepas fúngicas son escasos, ya que estos se han realizado principalmente en bacterias y levaduras (Priefert *et al.*, 2001).

Las concentraciones obtenidas de 4VG se encuentran por debajo de las obtenidas en cultivos de *Bacillus coagulans* (908 mg/l) (Karmakar *et al.*, 2000) o *Debaryomyces hansenii* (1470 mg/l) (Mathew *et al.*, 2007), sin embargo este estudio nos ha permitido conocer más profundamente la vía de biotransformación del AF por dos cepas del género *Aspergillus*. La conversión de AF con los dos medios de cultivo y las dos microorganismos estudiados, se caracterizó por presentar un valor cercano a 2/3 excepto para el caso de la cepa silvestre en medio B, donde la conversión es cercana a 1/3. La cepa *A. niger* DAR 2 favoreció la formación de 4VG en medio B, mientras que en medio A forma de manera indistinta 4VG ó AV. La cepa *A. niger* C28B25 en cualquiera de los medios sólo forma AV, el rendimiento de formación de AV es mayor en el medio B pero la conversión es baja.

### **9.3 BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO EN FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO POR LAS CEPAS *A. niger* C28B25 Y *A. niger* DAR 2 EN MEDIOS DE CULTIVO A y B.**

Se realizó un estudio preliminar para tener información sobre el crecimiento de las cepas fúngicas en ambos medios de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que ambas cepas en el medio de cultivo A tuvieron un mayor tiempo de crecimiento (36h), mientras que con el medio B, el periodo fue más corto (24h) debido a que el medio A contiene dos azúcares (maltosa 21 g/l y glucosa 3 g/l), mientras que el medio de cultivo B sólo sacarosa (3 g/l).

Las Figuras 9.8 y 9.9, muestran la tasa de producción de CO<sub>2</sub> durante la FMS de las cepas *A. niger* C28B25 y DAR 2 con los medios de cultivo A y B. Las curvas de CO<sub>2</sub> de *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 con el medio de cultivo A, mostraron que ambas cepas tuvieron una fase lag cercana a 8 h y se observó

un primer máximo de tasa de producción de CO<sub>2</sub>, a las 11 horas (Figura 9.8 y Figura 9.9), fenómeno que se explica debido al consumo de glucosa, fuente de carbono de fácil asimilación. Posteriormente se presentó un segundo máximo a las 19 h para *A. niger* C28B25 y de 20 h para la cepa *A. niger* DAR 2. Este comportamiento también se observó durante la fermentación de *A. tamarii* V12307 con ácido *p*-cumárico (Figura 8.7). El segundo máximo puede ser como consecuencia del consumo de la maltosa. Este comportamiento también se observó en los cultivos de la cepa *A. tamarii* V12307 con ácido *p*-cumárico (Figura 8.7), se observaron 2 tasas máximas de producción de CO<sub>2</sub>, a las 4.1 h y 11 h.

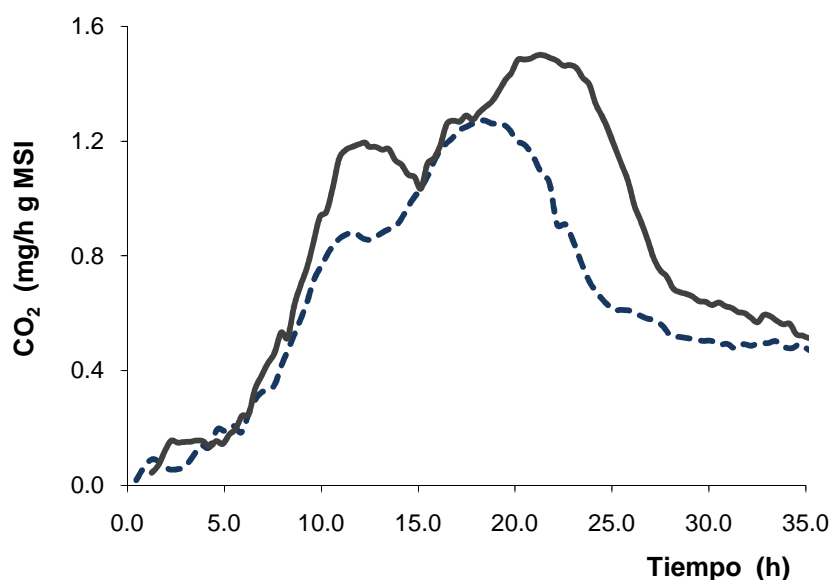


Figura 9.8. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> durante la FMS de *A. niger* C28B25 (...) y *A. niger* DAR2 (—) con ácido ferúlico como sustrato y medio A.

En el cultivo en medio sólido el medio B, ambas cepas presentaron una fase de retardo de 6- 7h.

A partir de los datos de la formación de CO<sub>2</sub> se obtuvieron los parámetros cinéticos correspondientes (Tabla 9.2).

En la Figura 9.8 se aprecia que la cepa silvestre se alcanzó la máxima tasa de formación de CO<sub>2</sub> a las 11.1 h y para la cepa diploide se presentó a las 13h. No

se observaron dos valores máximos de formación de CO<sub>2</sub> como con el medio A.

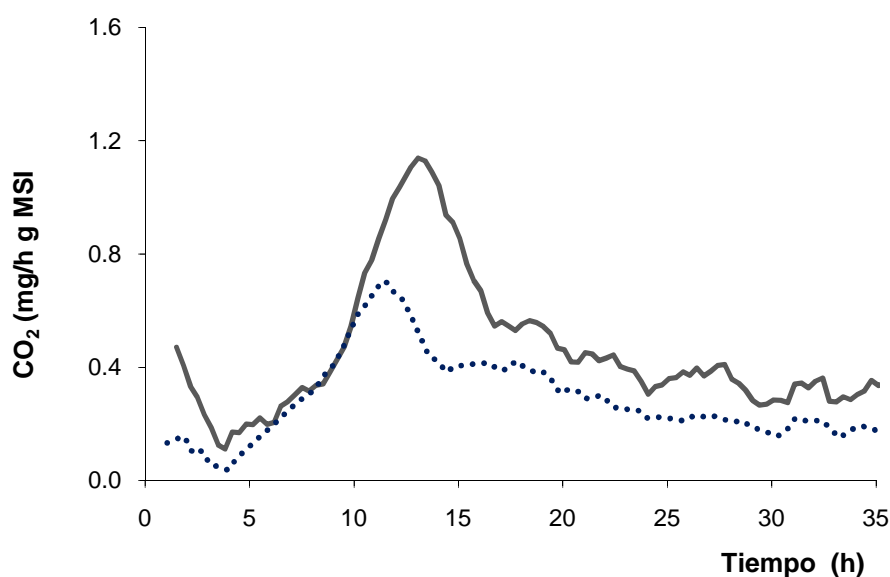


Figura 9.9. Tasa de producción de CO<sub>2</sub>; durante la FMS de *A.niger* C28B25 (...) y *A. niger* DAR2 (—) con ácido ferúlico como sustrato y medio B.

La duración de la fase lag es muy semejante. Además, con el medio de cultivo A, las tasas de máxima de producción de CO<sub>2</sub> se presentaron en un tiempo mayor que con el medio B.

Tabla 9.2. Parámetros cinéticos de la biotransformación de ácido ferúlico por *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 con los medios de cultivo A y B.

	<i>A. niger</i>	Duración fase lag (h)	$\mu_{CO_2}$ h <sup>-1</sup>	Tasa máxima de producción de CO <sub>2</sub> (mg CO <sub>2</sub> /h g MSI)
Medio A	C28B25	8	0.51	1.25
	DAR 2	8	0.58	1.48
Medio B	C28B25	7	0.38	0.8
	DAR 2	6	0.45	1.13

En la Tabla 9.2 se aprecia que en los ensayos con el medio A ambas cepas alcanzan tasas superiores de CO<sub>2</sub> que las que se obtuvieron con el medio B. Por otra parte, la cepa recombinante en ambos medios de cultivo alcanza tasas más altas de CO<sub>2</sub>, al comparar con la cepa silvestre.

Durante la FMS se analizaron la humedad y pH durante el transcurso de la fermentación para ambas cepas, los resultados se muestran en la Tabla 9.3

Tabla 9.3. Humedad y pH obtenidos durante la biotransformación de ácido ferúlico con *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 con los medios de cultivo A y B.

	<i>A. niger</i>	Humedad (%)		pH	
		Inicial	Final	Inicial	Final
Medio A					
	C28B25	69.5±0.65	62.5±0.7	6.72±0.01	3.5±0.15
	DAR 2	73.2±0.05	66.4±0.8	6.73±0.21	3.9±0.27
Medio B					
	C28B25	70.1±0.54	66.2±1	6.72±0.08	7.4±0.31
	DAR 2	67.2±0.49	53.1±0.7	6.70±0.06	7.9±0.15

Los valores de humedad muestran un descenso porcentual similar para ambas cepas en el medio A. Mientras que con el medio de cultivo B, la disminución de la humedad fue mayor en la cepa diploide. La pérdida de humedad durante la FMS es frecuente, a pesar de que la aireación en la FMS es con aire húmedo saturado, la pérdida de humedad se presenta debido al calor metabólico (Mitchell *et al.*, 2002).

El pH mostró cambios importantes en ambos medios. Para el caso del medio de cultivo A, se observa una acidificación del medio (Tabla 9.3). Mientras que con el medio de cultivo B, el efecto es el contrario, el pH incrementa en todos

los casos. Este efecto es resultado del crecimiento y formación de productos de biotransformación.

Tabla 9.4. Evolución del amonio, glucosa y maltosa durante la biotransformación de ácido ferúlico con las cepas *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 con medios de cultivo A.

<i>A. niger</i>	Tiempo (h)	Concentración de amonio (g/l)	Concentración de maltosa (g/l)	Concentración de glucosa (g/l)
DAR 2	0	1.8± 0.09	18.00± 0.09	3.00 ± 0.07
	8	1.04± 0.05	3.12± 0.30	6.19 ± 0.32
	36	0.95 ± 0.02	1.12 ± 0.12	0
C28B25	0	1.8± 0.02	18.0 ± 0.4	3.00 ± .14
	8	1.52 ± .01	3.61± .04	4.69 ± .07
	36	1.26 ± .06	3.55± .6	7.18± 0.7

La concentración del tartrato al final de la fermentación fue del 50% de la concentración inicial para la cepa diploide, mientras que en los extractos de la cepa silvestre el amonio residual fue de 70% de su valor inicial (Tabla 9.4).

La cinética de biotransformación del ácido ferúlico por las cepas silvestre *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 con medio de cultivo A, mostró que ambas cepas siguen la misma tendencia en el consumo de maltosa, ya durante las 8 primeras h de cultivo se consumió alrededor del 80% de la maltosa, después de este tiempo, aparentemente este azúcar ya no se consume de manera importante y al final del cultivo se encontró 17% en el cultivo con la cepa diploide y con la silvestre 19% (Tabla 9.4).

La Figura 9.10 muestra los perfiles de biotransformación del ácido ferúlico por *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 en cultivo en medio sólido.



En la fermentación en medio sólido con los medios A y B, ambas cepas degradaron el ácido ferúlico de manera importante aunque los niveles de conversión fueron ligeramente mayores en la *A. niger* C28B25 (Figura 9.10).

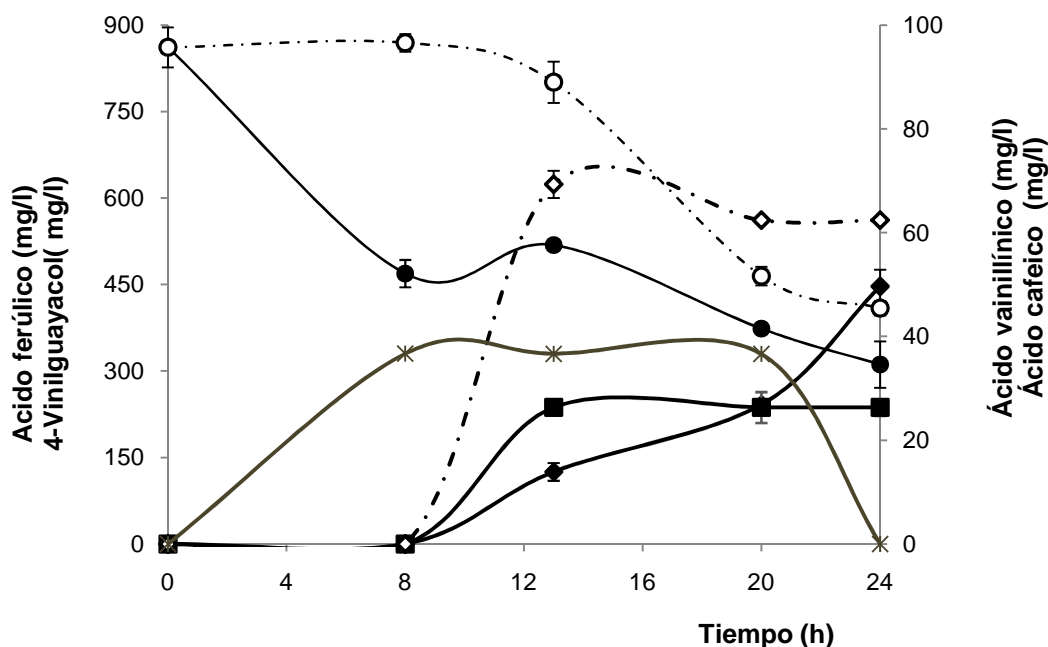


Figura 9.10 Productos de la biotransformación del AF por la cepa *A. niger* C28B25 y DAR2 en FMS con medio de cultivo B. AF (○●), AV (■), 4VG (◇◆), ácido caféico (\*). Los símbolos vacíos son para *A. niger* C28B25 y los llenos para *A. niger* DAR 2.

La cepa *A. niger* DAR 2 tuvo una conversión del AF del 59% y 63% con el medio A y B, respectivamente. Mientras que *A. niger* C28B25 presentó conversiones del 68% y 66%, para el medio A y B, respectivamente (Tabla 9.5).

En el análisis de los extractos de los cultivos de *A. niger* C28B25, con el medio de cultivo A, se encontraron trazas de alcohol vainillílico a las 20h de cultivo y a las 36h se determinaron 15 mg/l de AV, además se encontró un producto con un tiempo de retención de 1.55 min, el cual no pudo ser identificado, razón por la cual no es posible calcular los rendimientos (Tabla 9.5).

Con el medio B, la cepa silvestre biotransformó el AF en ácido caféico y 4VG (Figura 9.10), con un RM del 20 y 46, respectivamente. Durante la FMS, con el

medio B, el AF fue biotransformado lentamente durante las primeras 8h; a las 20h sólo se detectó el 53% del AF (Tabla 9.4).

Tabla 9.5 Conversión y rendimiento molar de la biotransformación del ácido ferúlico en FMS por las cepas *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR con el medio de cultivo A y B.

Conversión	<i>A. niger</i> C28B25	<i>A. niger</i> DAR 2
Medio A		
Conversión AF (%)	68	59
Medio B		
Conversión AF (%)	66	63
RM 4VG/ AF (M/M)	46	76
RM ACF/AF (M/M)	20	ND
RM AV/AF (M/M)	ND	5

Es importante destacar que el periodo de concentración elevada del ácido caféico (Figura 9.10), coincide con la fase exponencial de crecimiento (Figura 9.9) y en ese momento sólo queda un 15% del azúcar en el medio. El ácido caféico es acumulado hasta las 20h y posteriormente es metabolizado. Este mecanismo ha sido reportado principalmente en bacterias como *Clostridium methoxybenzovorans* (Mechichi *et al.*, 1999), con una transformación del ácido ferúlico en ácido caféico a través de una *o*- desmetilación del compuesto fenólico.

*A. niger* C28B25 presenta la máxima concentración de 4VG a las 12h cuando hay 14% de azúcares en el medio. La concentración del 4VG disminuye a las 20h y al final de la FMS se determinaron 63 mg/l.

El análisis de los productos de biotransformación mostró que con el medio de cultivo A, *A. niger* DAR 2 biotransformó el ácido ferúlico en AV a las 36h de cultivo, se detectaron aproximadamente 30 mg/l de este compuesto y como

producto mayoritario un compuesto con tiempo de retención de 1.81 min, el cual no pudo ser identificado.

Por otro lado, con el medio de cultivo B, *A. niger* DAR 2, biotransformó el AF en 4VG y AV, con un RM de 76% y 5%, respectivamente (Figura 9.10). Durante las 8 h de cultivo no se detectaron productos de la biotransformación del AF, sino hasta las 12 h, donde se detectaron 125 mg/l de 4VG y 26 mg/l de AV. La concentración del AV permanece constante hasta el final de la fermentación, mientras que la concentración del 4VG incrementa hasta alcanzar una concentración final de 446.78 mg/l.

Durante la biotransformación del ácido ferúlico en FMS, se encontró que el medio de cultivo juega un papel muy importante en la formación de productos. Con el medio de cultivo A se obtuvieron altas conversiones en dos productos principales con tiempo de retención 1.55 min y 1.81min (no identificados), para *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2, respectivamente. Por otro lado con el medio B, se encontró que el ácido ferúlico es biotransformado en 4VG y ACF por *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR2 biotransformó el AF en 4VG y AV.

La comparación de la FMS con la FML de la transformación del ácido ferúlico permite establecer diferencias importantes. De las condiciones probadas con ambas cepas, se muestra las condiciones que favorecen la conversión del AF por orden de importancia:

1. FML y medio de cultivo A,
2. FMS con medio B,
3. FMS y medio de cultivo A,
4. FML con medio de cultivo B.

La cepa *A. niger* DAR 2 biotransformó el AF en 4VG en cultivo líquido y sólido, con excepción de la FMS y medio A. Se obtuvieron RM de 14, 57 y 76 para la FML y medio A, FML y medio B y FMS con medio B, respectivamente. Esta cepa también produjo AV con RM de 15, 13 y 5 para la FML y medio A, FML y medio B y FMS con medio B, respectivamente. Para la obtención de estos

productos es necesario que en un primer paso de este sistema de biotransformación del AF se lleve a cabo una descarboxilación oxidativa del AF, la cual puede ser parte del sistema de detoxificación de los microorganismos y evitar llegar a un nivel inhibitorio. Un mecanismo similar ha sido observado en el metabolismo secundario, particularmente en la vía del ácido fenilpropenóico (Seshime *et al.*, 2005).

La cepa DAR2 en FMS con el medio B mostró mayores concentraciones de 4VG en un tiempo menor que la FML con el mismo medio. Este comportamiento ha sido reportado en la FMS, las fermentaciones son más cortas, se tienen rendimientos mayores, ya que es menor la producción de proteasas que puedan inhibir las enzimas responsables de la biotransformación (Hölker y Lenz, 2005).

En medio B las concentraciones de 4VG por *A. niger* DAR2 fueron 228 mg/l y 446 mg/l, para la FML y FMS, a 120 y 24 h respectivamente, en términos de la productividad de 4VG, se encontraron valores de casi 10 veces más en la FMS, 18.5 mg/l h en comparación con 1.9 mg/l h encontrados con FML.

Se ha observado el mismo comportamiento de incremento en la productividad en los estudios de producción de metabolitos secundarios cuando se usan ambos sistemas de cultivo, los metabolitos se incrementan y este comportamiento se encuentra asociado a la formación de hifas aéreas y la producción de esporas en la fase estacionaria de crecimiento microbiano (Robinson *et al.*, 2001).

La preferencia de la descarboxilación no oxidativa por *A. niger* DAR 2 a diferencia de *A. niger* C28B25, posiblemente esté relacionada con la desregulación en la producción de enzimas.

Por otro lado, *A. niger* C28B25 mostró como producto de biotransformación el AV, preferentemente y se observaron RM de 22 y 57, para la FML con medio A y FML con medio B, respectivamente. De forma diferente, en la FMS con medio B, el mismo microorganismo tuvo como producto principal de la biotransformación del ácido ferúlico al ácido caféico.

Los cultivos con pH final cercano a la neutralidad de 7.4, fueron los que presentaron como producto principal el 4VG. En los sistemas donde se encontraron diversos productos de biotransformación, el pH tuvo valores ácidos.

Es importante resaltar la reproducibilidad que se tuvo en los resultados obtenidos con *A. niger* DAR 2. Barthelmebs *et al.*, (2000), clonaron la enzima ferúlico descarboxilasa de *L. plantarum* con el objetivo de optimizar la síntesis de 4VG y encontraron inestabilidad en el sistema que se reflejó en las bajas concentraciones obtenidas de 4VG.

Después de haber estudiado el comportamiento de la biotransformación del AF por *A. niger* C28B25 y *A. niger* DAR 2 en cultivo líquido y sólido se puede proponer una vía de transformación (Figura 9.11 y 9.12). En la Figura 9.11, se observa con *A. niger* DAR2 el ácido ferúlico sufre una descarboxilación del ácido ferúlico en 4-vinilguayacol, seguida de dos oxidaciones para generar vainillina y ácido vainillínico, que posteriormente es descarboxilado e hidroxilado para formar la metoxihidroquinona. Aunque también se observa que la vainillina es reducida para formar el alcohol vainillílico. Mientras que *A. niger* C28B25 sólo oxida el ácido ferúlico en ácido vainillínico, con una posterior descarboxilación e hidroxilación para formar la metoxihidroquinona.

En la Figura 9.12 el mecanismo es muy similar, excepto para *A. niger* C28B25, ya que se presenta una metoxilación del ácido ferúlico para generar el ácido cafeico.

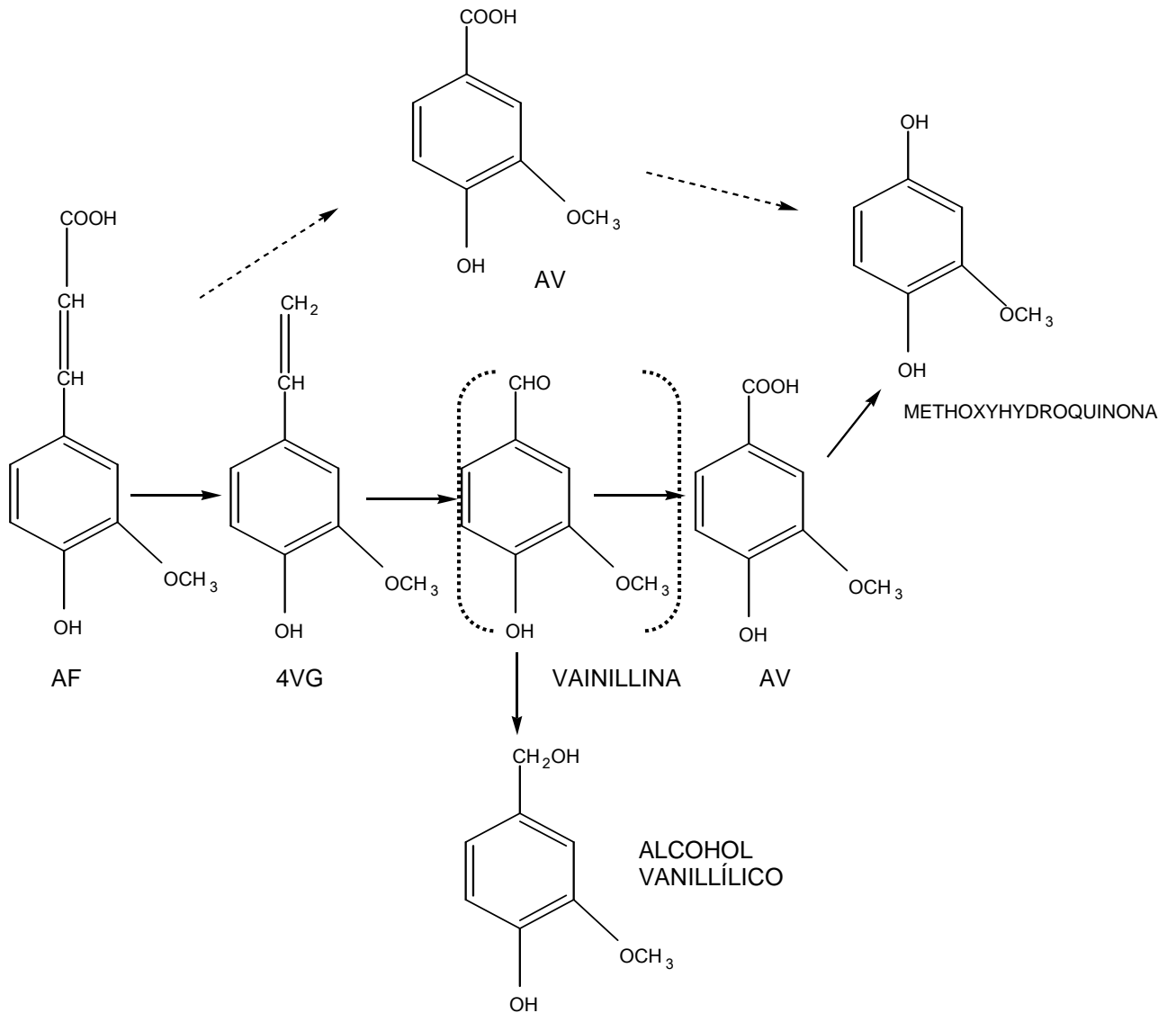


Figura 9.11. Rutas de biotransformación del AF por *A. niger* C28B25 (Flechas punteadas) y *A. niger* DAR 2 en FML con medio de cultivo A y B. Los corchetes indican intermediarios propuestos en la ruta de biotransformación.

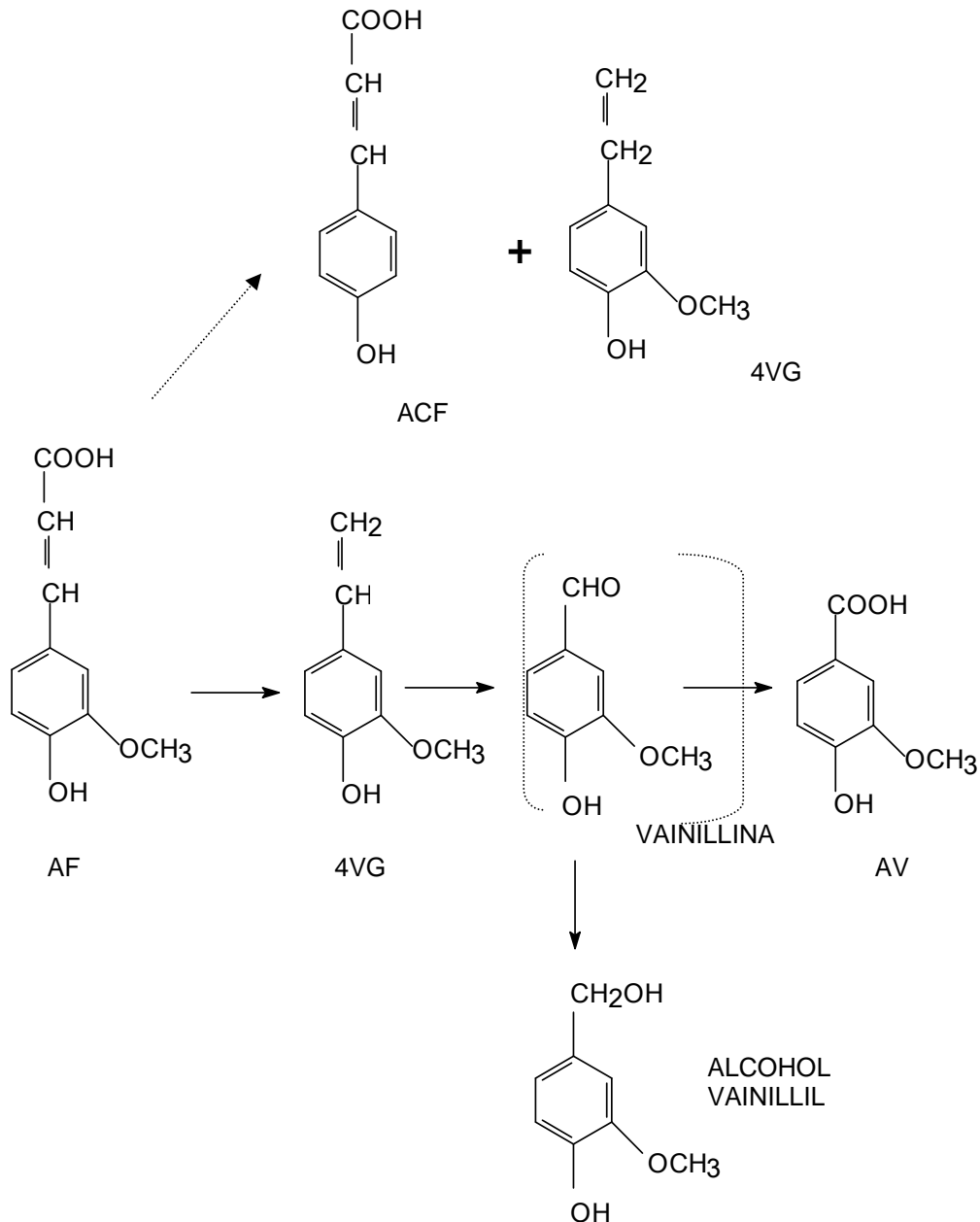


Figura 9.12. Rutas de biotransformación del AF por las cepas *A. niger* C28B25 (Flechas punteadas) y *A. niger* DAR 2 en FMS con medio de cultivo B. Los corchetes indican intermediarios propuestos en la ruta de biotransformación.

Finalmente, en este estudio observamos que *A. niger* C28B25 preferentemente biotransformó el AF vía degradación de la cadena propenóica en AV y no sigue una vía como *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637, donde el AF es

biotransformado en vainillina, que posteriormente es oxidada para formar AV que a su vez es biotransformado en guayacol y ácido protocatecólico (Ghosh *et al.*, 2007). *A. niger* DAR 2 llevó a cabo la transformación a través de la descarboxilación del AF a 4VG, este mecanismo ha sido ampliamente reportado en bacterias (Cavin *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Karmakar *et al.*, 2000), levaduras (Mathew y Abraham, 2006; Suezawa and Susuki, 2007) e incluso hongos (Nazareth y Mavinkurve, 1986; Rahouti *et al.*, 1989).

La biotransformación del ácido ferúlico en cultivo sólido mostró ventajas sobre el cultivo líquido, en cuanto a la productividad del 4VG. Aunque, no todos los compuestos obtenidos en medio A fueron identificados.

Cabe destacar que *A. niger* DAR 2 es una cepa fue obtenida por recombinación parasexual, sin transferencia de genes entre especies, por lo que conserva su característica como cepa GRAS, por lo que puede ser usada en procesos biotecnológicos para la obtención de 4VG por vías reconocidas como naturales para el consumo humano.

En el estudio de la biotransformación del ácido ferúlico con *A. niger* DAR 2, se realizaron etapas de purificación parcial de la enzima ferúlico descarboxilasa, los resultados obtenidos, se presentan en la siguiente sección.

#### **9.4 IDENTIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA DESCARBOXILASA RESPONSABLE DE LA BIOTRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO FERÚLICO EN 4-VINILGUAYACOL DE *A. niger* DAR 2.**

El estudio de las descarboxilasas del AF en 4VG se ha realizado principalmente en bacterias y levaduras. En 1995, Degrassi *et al.*, aislaron una ferulato descarboxilasa en *Bacillus pumilus* PS213; Donaghy *et al.*, (1999), usaron las cepas *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula minuta* y *Candida lambica*, para el aislamiento de las descarboxilasas, utilizaron ácido ferúlico como sustrato y se obtuvo el 4-vinil guayacol. Debido a que el estudio de la descarboxilasa del ácido ferúlico se ha centrado en levaduras y bacterias, surge el interés de purificar parcialmente en una cepa del género *Aspergillus*.



El estudio se desarrolló con el extracto de la cepa *A. niger* DAR 2. Se obtuvieron los extractos enzimáticos como se detalla en la sección 5.8, se evaluó la actividad enzimática en función del pH y temperatura (sección 5.12), posteriormente se realizó la purificación parcial de la enzima con la técnica de intercambio iónico y filtración en gel, el análisis de las actividades enzimáticas en los extractos intracelulares y extracelulares. Durante los ensayos enzimáticos sólo se encontró actividad medida en el extracto intracelular con base en la generación de producto (4VG). Para conocer el comportamiento de la actividad enzimática en el tiempo, se realizó una curva de progreso a 40°C y pH 6 (Figura 9.7), los datos se reportan en U/ mg de proteína. Una U es la cantidad de enzima necesaria para producir 1µmol de 4VG en un minuto.

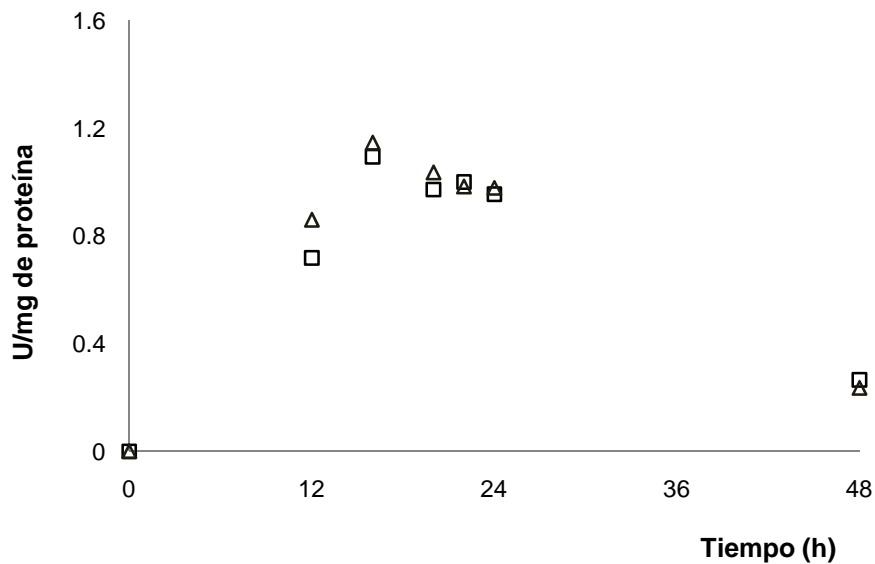


Figura 9.13 Actividad enzimática del extracto intracelular de *A. niger* DAR 2. Los símbolos indican los valores obtenidos por duplicado.

Durante 48 horas se midió la actividad enzimática a través de la formación de producto (Figura 9.13). En esta gráfica podemos observar que a medida que el tiempo incrementa, la actividad enzimática decrece, esto se debe a que el sustrato se consume en la reacción. Una vez obtenido el perfil de actividad enzimática se calculó la actividad de la descarboxilasa del ácido ferúlico presente en el extracto intracelular, la cual fue obtenida a partir de la pendiente

de la curva en función del tiempo. Para esta reacción enzimática se obtuvo una actividad de 30 mU/mg de proteína a pH 6 y 40°C.

#### 9.4.1 EVALUACIÓN DEL pH Y TEMPERATURA EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO INTRACELULAR DE *A. niger* DAR 2.

El ensayo enzimático se realizó con diferentes valores de pH (4, 5, 6, 7 y 8). Los resultados mostraron que a pH de 6 se observó la mayor actividad enzimática con un valor de 30 mU/mg de proteína. En extractos de *Debaryomyces hansenii* se encontró mayor actividad al mismo valor de pH, 1.02 U/ mg de proteína (Mathew *et al.*, 2007).

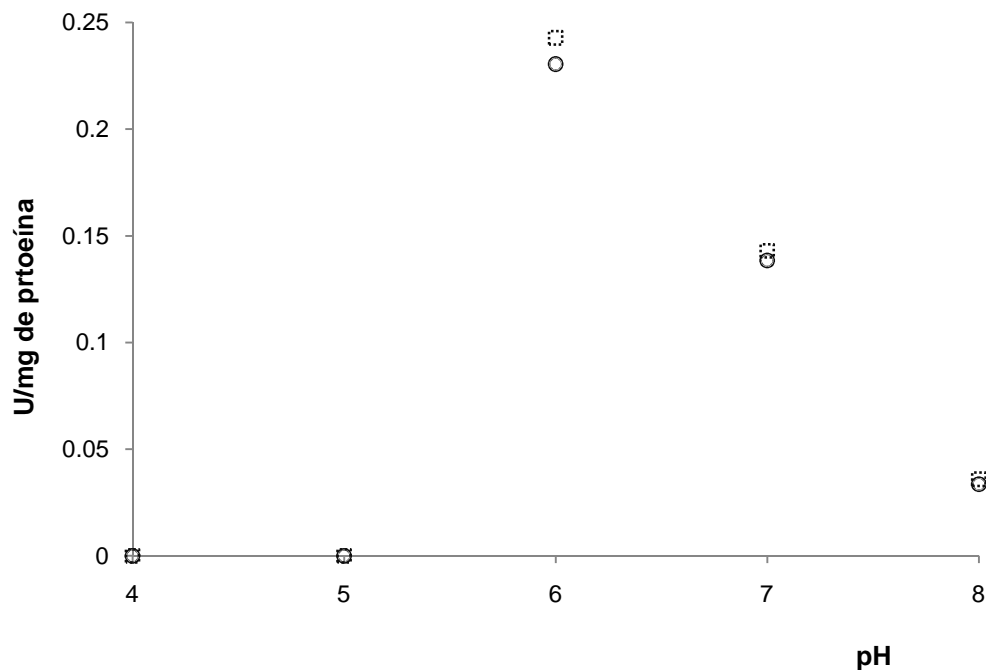


Figura 9.14. Efecto del pH en la actividad enzimática del extracto intracelular de *A. niger* DAR 2. Los símbolos indican los valores obtenidos por duplicado.

Se evaluó el efecto de la temperatura en la actividad enzimática del extracto intracelular a 30, 40, 50, 60, 70 y 80°C. El pH inicial en todos los casos fue de 6 (Tabla 9.5).

Tabla 9.5. Efecto de la temperatura en la actividad enzimática de la descarboxilasa del ácido ferúlico del extracto intracelular de la *A. niger* DAR 2.

Temperatura (°C)	mU/mg proteína
30	6 ± 0.011
40	13 ± 0.030
50	4 ± 0.002
60	ND
70	ND
80	ND

ND: no detectada

La mayor actividad se presentó a 40°C. A 30 y 50°C la actividad fue menor y a temperaturas superiores, no se detectó actividad. Se ha reportado que en extractos de *Bacillus subtilis* la temperatura óptima se presenta a los 30°C (Cavin *et al.*, 1997).

En este estudio no fue posible determinar la actividad de la descarboxilasa de *A. niger* DAR 2 en el extracto crudo, la actividad enzimática sólo se presentó en los extractos intracelulares libres de células. La actividad específica de la ferulato descarboxilasa de la cepa *A. niger* DAR 2 fue de 0.013 U/ mg de proteína. Se ha reportado que los extractos de *B. pumilis* presentan una actividad de 1.2 U/mg de proteína (Degrassi *et al.*, 1995), *C. lambica* 52.6 mU/mg proteína, *Rhodotorula rubra* 24.5 mU/ mg proteína, *Rhodotorula minuta* 12 mU/ mg proteína (Donaghy *et al.*, 1999). Aunque en nuestro estudio, la actividad es baja, presenta actividad semejante a la de *Rhodotorula minuta*

Los diferentes estudios sobre las descarboxilasas han demostrado que esta enzima se encuentra asociada a la membrana o es intracelular, ya que se ha detectado la actividad enzimática hasta que las células son lisadas.

### 9.4.2 PURIFICACIÓN PARCIAL POR INTERCAMBIO IÓNICO DE LA ENZIMA FERÚLICO DESCARBOXILASA DE *A. niger* DAR 2.

La técnica de intercambio iónico fue utilizada en la primera etapa de la purificación, se colocaron 60 ml del extracto intracelular en la columna de intercambio aniónico y se recuperaron 7 diferentes fracciones (Figura 9.15).

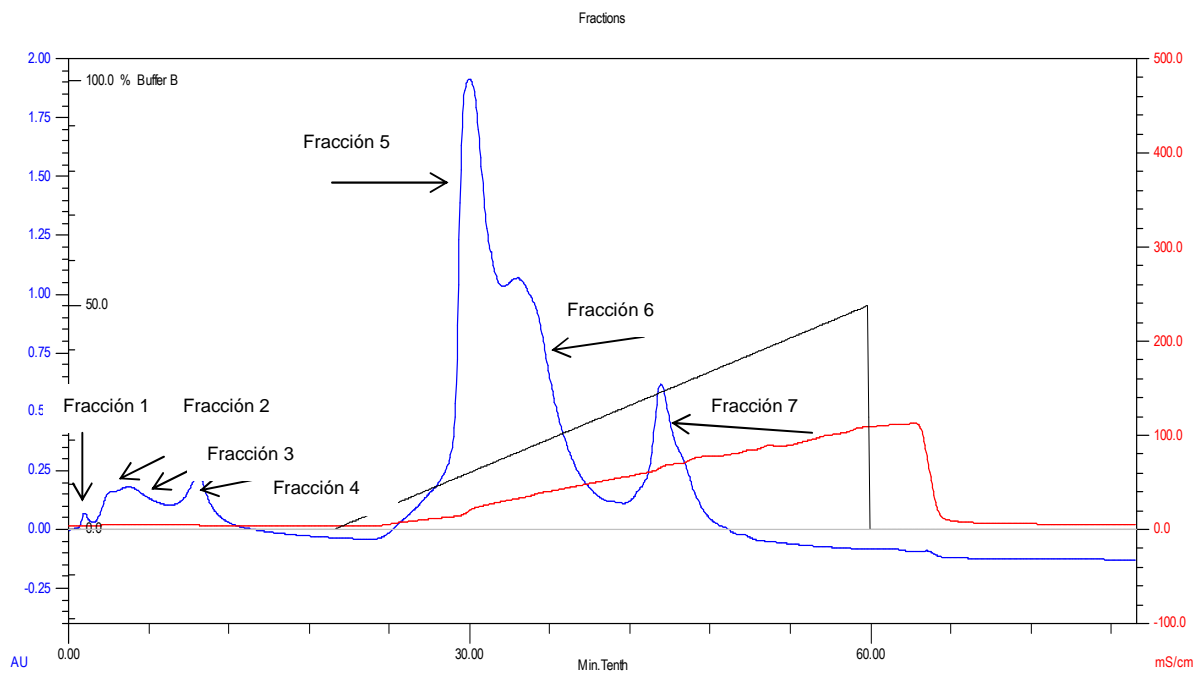


Figura 9.15. Cromatograma de intercambio aniónico del extracto intracelular de *A. niger* DAR 2.

Cada fracción fue colectada, dializada y se realizó el ensayo de actividad enzimática. De las 7 fracciones colectadas, solo una de ellas mostró actividad, (la fracción 1), 10 m U/mg de proteína

### 9.4.3 PURIFICACIÓN POR FILTRACIÓN EN GEL DE LA ENZIMA FERÚLICO DESCARBOXILASA DE *A. niger* DAR 2.

La fracción obtenida por intercambio aniónico que demostró actividad se analizó por la técnica de filtración en gel (Figura 9.16).

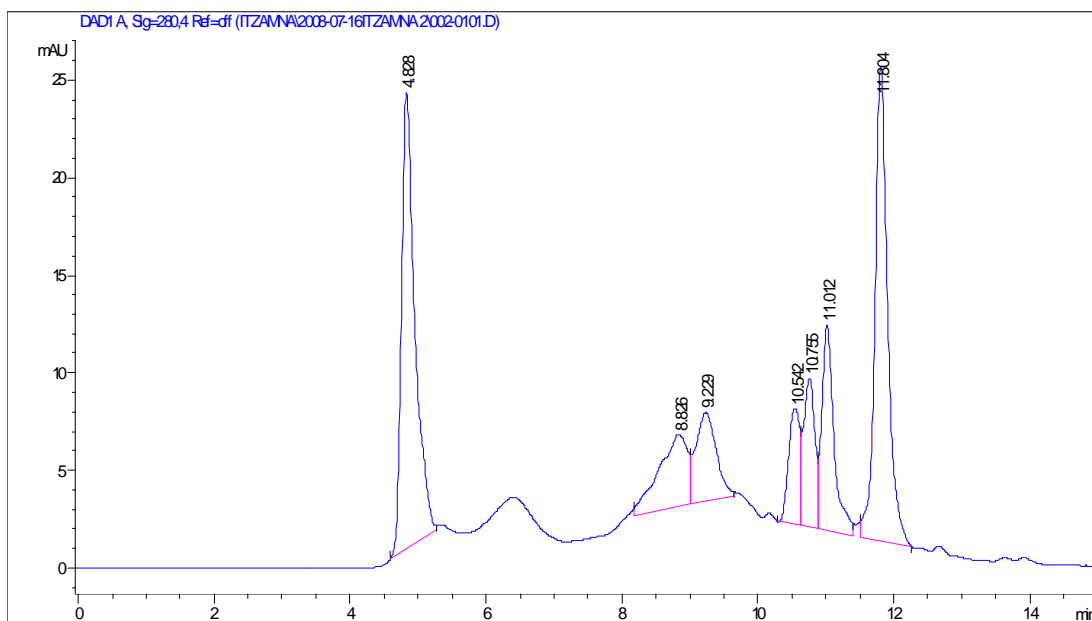


Figura 9.16. Cromatograma de filtración en gel de la fracción 1 a partir de la columna de intercambio aniónico de *A. niger* DAR2.

Se obtuvieron 7 fracciones a las que se les determinó el peso molecular a partir de la curva estándar, elaborada con la solución de referencia recomendada por el fabricante. Las fracciones obtenidas se muestran en la Tabla 9.4.

Tabla 9.4. Fracciones obtenidas por filtración en gel.

Tiempo de retención (min)	PM (kDa)
4.8	755.0
8.8	224.6
9.2	198.8
10.5	133.5
10.7	125.1
11.0	115.7
11.8	91.0

Los pesos moleculares calculados de las 7 fracciones obtenidas fueron comparados con los reportados por otros autores debido a que después de someter al extracto enzimático a las diferentes etapas de purificación, ya no fué posible determinar actividad enzimática.

La fracción con el peso molecular de 91 kDa podría ser la proteína responsable de la descarboxilación del AF en 4VG, se ha reportado que la descarboxilasa de *L. plantarum* presenta un peso molecular de 93kDa, y su estructura es un homotetrámero con actividad máxima a 30°C y pH 5.5-6 (Cavin *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos durante la purificación parcial de la enzima ferúlico-decarboxilasa del extracto intracelular de la cepa *A. niger* DAR 2 sugiere que la enzima es intracelular, con un pH y temperatura óptima de 6 y 40°C, respectivamente. Posiblemente se trata de una enzima que presenta un peso molecular aproximado de 91kDa. Es preciso realizar un mayor número de análisis para confirmar estos resultados, ya que no existen reportes previos sobre la purificación de enzimas de esta naturaleza en el género *Aspergillus*.

---

*CAPÍTULO 10*  
*CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS*

## 10. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se estudió la biotransformación del ácido clorogénico, *p*-cumárico y ferúlico que son ácidos hidroxicinámicos que se encuentran presentes en la pulpa de café. El estudio se realizó con cepas aisladas de las zonas cafetaleras de Veracruz y Chiapas, para la obtención de antioxidantes y precursores de aromas

Las cepas aisladas del nicho biológico del café presentaron capacidad para biotransformar los ácidos hidroxicinámicos. De las 19 cepas estudiadas, sólo 8 cepas mostraron actividad, 7 del género *Aspergillus* y 1 del género *Penicillium*. Ninguna de estas 8 cepas, silvestre o modificada mostró la capacidad de biodegradar todos los sustratos con respecto a la vía de referencia hasta vainillina, sin embargo, se encontró que poseen diferentes capacidades enzimáticas para biotransformar ácidos hidroxicinámicos en los intermediarios de esta vía, además de otras moléculas interesantes (como el 4-vinilguayacol).

Con *A. niger* C23308 en cultivo líquido con un medio con bajas concentraciones de azúcar, se obtiene como producto 371 mg/l de ácido caféico y 24 mg/l de ácido protocatecónico a partir de 800 mg/l de ácido clorogénico. Ambos productos con propiedades antioxidantes importantes. Por lo que podría ser aplicado en la pulpa de café, ya que la concentración del ácido clorogénico en este subproducto es de 3097 mg/kg.

La biotransformación del ácido *p*-cumárico en cultivo líquido por *A. tamarii* V12307 con medio de cultivo A (altas concentraciones de azúcares), muestra que posiblemente el mecanismo de reacción es por medio de la degradación de la cadena propenónica para la formación del ácido *p*-hidroxibenzóico. *A. tamarii* mostró una productividad de 5 mg/l h de ácido *p*-hidroxibenzóico de 2.5 veces mayor, comparada a la de *P. variotii* de 2 mg/l h (Sachan *et al.*, 2006)

La misma cepa *A. tamarii* en cultivo líquido y medio de cultivo B (bajas concentraciones de azúcar), muestra la capacidad de generar el ácido caféico como se establece en la vía de referencia. Esta reacción de biotransformación



sugiere la presencia de la enzima o-metiltransferasa en el microorganismo. La productividad alcanzada con esta cepa fue de 144 mg/ l d, 9 veces mayor que la obtenida con *P. cinnabarinus* de 16 mg/ l d (Estrada- Alvarado *et al.*, 2003).

En cultivo sólido, *A. tamarii* V12307, biotransforma el ácido *p*-cumárico con rendimientos de 56% y 24%, con medio de cultivo A y B. en diversos compuestos, con medio A, sólo se produce un compuesto. Los productos obtenidos por cultivo sólido deberán ser identificados posteriormente.

*A. niger* C17309 en cultivo líquido biotransforma el ácido *p*-cumárico en intermediarios del hidroxibenzoato, generando compuestos de alto valor agregado como el 4-hidroxibenzaldehído, el metil-4- hidroxibenzoato, la hidroquinona y el 4-propilfenolen en una proporción de 2.47%, 0.54%, 10.6%, 0.65%, respectivamente. La presencia de estos compuestos sugiere que las reacciones se dan a nivel de la cadena propenóica y no en el anillo aromático.

El ácido ferúlico en cultivo líquido es biotransformado por *A. niger* C28B25 por la vía de la degradación de la cadena propenóica en ácido vainillínico. Además, se observó una productividad en términos de mg/ l d de 3 veces mayor con *A. niger* C28B25 que la reportada con *P. variotii* MTCC 6581 (Ghosh *et al.*, 2006)

La biotransformación del ácido ferúlico en 4-vinilguayacol por *A. niger* DAR 2, se efectúa preferencialmente por la descarboxilación no oxidativa.

El cultivo sólido mostró ser una herramienta interesante en el proceso de biotransformación del ácido ferúlico en 4-vinilguayacol que tiene un valor de 40 veces mayor que el ácido ferúlico y que es ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica. En cultivo sólido la producción fue de casi el doble de 4 vinilguayacol que en cultivo líquido en una tercera parte del tiempo, también se observó una generación de productos diferente, ya que la cepa silvestre C28B25 en cultivo sólido biodegradó el ácido ferúlico en ácido caféico, mientras que en cultivo líquido no se observó este producto.

Un exceso de azúcares en el medio de cultivo puede inhibir de alguna manera la generación de productos y no sólo la presencia de azúcares de fácil asimilación, como ya estaba reportado (Ander *et al.*, 1980; Lesage Meesen *et al.*, 1997).)

En la vía de biotransformación del ácido ferúlico en cultivo sólido y líquido se presentan reacciones principalmente a nivel de la cadena propenóica, a excepción del cultivo sólido con la cepa silvestre C28B25, donde se observó una desmetilación del anillo.

El estudio de la purificación de la enzima ferúlico descarboxilasa a partir del extracto de *A. niger* DAR 2, mostró que la enzima es intracelular con un pH y temperatura óptima de 6 y 40°C, respectivamente y que posiblemente es una enzima con un peso molecular aproximado de 91kDA. Este último dato deberá confirmarse posteriormente.

Los productos obtenidos en este estudio mediante transformaciones microbianas con cepas GRAS, pueden ser usados para consumo humano; Además son naturales por haber sido obtenidos mediante procesos de biotransformación.

El desarrollo de este estudio, permite responder a la hipótesis planteada. En cultivo sólido, con el uso de cepas de *Aspergillus* aisladas del nicho del café se obtienen una mayor diversidad de compuestos y diferencias en la productividad al comparar con el sistema en medio líquido

Este trabajo abre un campo prometedor para la producción de compuestos de alto valor agregado, ya que los resultados obtenidos en este estudio podrían ser extrapolados a otros subproductos agroindustriales con cantidades interesantes de ácidos hidroxicinámicos.

En un futuro sería interesante:

- Identificar y caracterizar los diferentes compuestos obtenidos que debido a la diversidad y concentración no pudieron ser identificados.
- Purificar la enzima ferúlico descarboxilasa a partir del extracto enzimático de *A. niger* DAR 2, ya que no hay reportes previos sobre la purificación de enzimas de esta naturaleza en el género *Aspergillus*.
- Realizar estudios enzimáticos en las diferentes etapas de la biotransformación.
- Realizar estudios entre las cepas modificadas para la mejora de productividades en la biotransformación.
- Continuar con estudios a futuro que permitan escalar el sistema para la producción de compuestos de alto valor agregado.

---

*CAPÍTULO 11*  
*REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelkafi S., Labat M., Casalot L., Chamkha M., Sayadi S. (2006). Isolation and characterization of *Halomonas* sp. strain IMPC, *p*-coumaric acid-metabolizing bacterium that decarboxylates other cinnamic acids under hypersaline conditions. *FEMS Microbiology Letters*. 255, 108–114.

Achterholt S., Priefert H., Steinbüchel A. (2000). Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR 167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54, 799-807.

Adachi O., Ano Y., Akakabe Y., Shinagawa E. Matsushita K. (2008). Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 81, 143–151.

Ander P., Hatakka A., Eriksson K-E. (1980). Vanillic Acid Metabolism by the White –Rot Fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*. 125, 189-202.

APHA WWA WPCF (1992). Standard Methods for the examination of water and wastewater, 16 Ed. Washington, EUA.

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.

Asther M., Estrada- Alvarado M., Haon M., Navarro D., Asther M., Lesage-Meessen L., Record E. (2005). Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalyzing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Biotechnology* 115, 47-56.

Barghini P., Di Gioia D., Fava, F., Ruzzi, M., (2007). Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions. *Microbial Cell Factories*. 6, 1-11.

Barthelmebs L., Divies C., Cavin J. (2000). Knockout of the *p*-coumarate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum* reveals the existence of two other inducible enzymatic activities involved in phenolic acid metabolism. *Applied Environmental Microbiology*. 66, 3368–3375.

Becker E., Nissen L., Skibsted L. (2004). Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects. *European Food Research and Technology*. 219, 561-576.

Bhat S.V., Nagasampagi B.A., Sivakumar M. (2005). Chap 9. Phenolics, natural dyes and pigments. Pp 585-619 en *Chemistry of Natural Products*. Springer Berlin Herdelberg New York.

Bizujoc M., Ledakowicz S. (2004). The kinetics of simultaneous glucose and fructose uptake and product formation by *Aspergillus niger* in citric acid fermentation. *Process Biochemistry*. 39, 2261-2268.

Bonnin E., Brunel M., Gouy Y., Lesage-Meessen L., Asther M., Thibault JF. (2001). *Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533 selected for the biotransformation of ferulic acid to vanillin, are also able to produce cell wall polysaccharide-degrading enzymes and feruloyl esterases *Enzyme and Microbial Technology*. 28, 70-80.

Brunati M., Marinelli F., Bertolini C., Gandolfi R., Daffonchio D., Molinari F. (2004). Biotransformations of cinnamic and ferulic acid with actinomycetes. *Enzyme and Microbial Technology*. 34, 3-9.

Castelluccio C., Paganga G., Melikian N., Bolwell P., Pridham J., Sampson J., Rice-Evans C. (1995). Antioxidant potencial of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *FEBS Letters*. 368, 188-192.

Cavin J., Barthelmebs L., Guzzo J., Van Beeumen ., Travers s., Divies C. (1997). Purification and characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters*. 147, 291-295.

Cavin J., Barthelmebs L., Divies C. (1997b). Molecular characterization of an inducible *p*-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum*: gene cloning, transcriptional analysis, overexpression in *Escherichia coli*, purification, and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 1939-1944.

Cavin J., Dartois V., Diviès C. (1998). Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64, 1466-1471.

Clifford M. (2000). Chlorogenic acids and other cinnamates- natures, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80, 1033-1043.

Crozier A., Jaganath I., Clifford M.N. (2006). Chap 1. Phenols, polyphenols and tannins: An Overview. pp 1-24 en Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the human Diet. Blackwell Publishing Ltd.

Contreras-Domínguez M. (2002) Selección y estudio cinético de cepas lácticas degradadoras de ácido gálico. Tesis de Maestría en Biotecnología UAMI

Degrassi G., Polverino De Laureto P., Bruschi C.(1995). Purification and characterization of ferulate and *p*-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 326-332.

Delneri D, Degrassi G, Rizzo R, Bruschi CV. (1995). Degradation of trans-ferulic and *p*-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM586. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1244, 363-367.

Donaghy J., Kelly P. and McKay A. (1999). Conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by yeasts isolated from unpasteurised apple juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79, 453 - 456.

Estrada-Alvarado I., Lomascolo A., Navarro M., Asther M., Lesage-Meessen L. (2001). Evidence of a new biotransformation pathway of *p*-coumaric acid into *p*- hydroxybenzaldehyde in *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57, 725-730.

Estrada-Alvarado I., Navarro D., Record E., Asther M., Lesage- Meessen L. (2003). Fungal biotransformation of *p*-coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: an alternative for producing a strong natural antioxidant. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19, 157-160.

Falconnier B., Lapierre C., Lesage- Meessen L., Yonnet G., Brunerie P., Ceccaldi-Colona B., Corrieu G., Asther M. (1994). Vainillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *P.cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology*. 37, 123-132.

García H., Duhalt R. (1998). Cuantificación de proteínas: una revisión. *Bioteconología*. 3, 77-88.

García A., Fulton J. (1996). The combination of Glycolic acid end hydroquinone or kojic acid for the treatment of melasma and related conditions. *Dermatologic Surgery*. 22, 443-447.

Ghosh s., Sachan A., Mitra A. (2005). Degradation of ferúlico acid by a white rot fungus *Schizophyllum commune*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21, 385-388.

Ghosh, S., Sachan, A., Mitra, A.,(2006). Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotii* MTCC 6581. *Current Science*. 90, 825–829.

Ghosh S., Sachan A., Kumar Sen S., Mitra A. (2007). Microbial transformation of ferulic acid to vanillic acid by *Streptomyces sannanensis* MTCC 6637. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 34:131–138.



Gupta J., Hamp S., Buswell J., Eriksson K. (1981). Metabolism of Trans-Ferulic Acid by the white –rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. *Archives of Microbiology*. 128, 349-354.

Gutiérrez-Sánchez G. (2000). Degradación de cafeína en presencia de ácido tánico por *Penicillium commune* PV33A25. Tesis de Maestría en Biotecnología UAMI.

Hedge S., Cavita S., Varadaraj M.C., Muralikrishna. (2006). Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid by *A. niger* CFR 1105. *Food Chemistry*. 96, 14-19.

Hölker U. Lenz J (2005) Solid-state fermentation — are there any biotechnological advantages? *Current Opinion in Microbiology*. 8, 301-306

Hooper W., Mahadevan A. (1997). Degradation of catechin by *B. japonicum*. *Biodegradation*. 8, 159-165.

Huang, Z., Dostal, L., John, P., Rosazza, N., 1993. Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol. *Journal of Biological Chemistry*. 268, 23954–23958.

Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P.N. (1994). Purification and characterization of ferúlico acid decarboxylase from *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*. 176, 5912-5918.

INEGI (2009). México de un vistazo. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

Inoue K., Sewalt V., Murray Balance G., Weiting C., Sturzer W., Dixon R. (1998). Developmental Expression and Substrate Specificities of alfalfa Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl Coenzyme A 3-o-Methyltransferase in Relation to Lignification. *Plant Physiology*. 117, 761–770.

Karmakar B., Vohra R.M., Nandanwar H., Sharma P., Gupta K.G., Sobti R.C., 2000. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology*. 80, 195–202.

Kawabe T., Morita H (1994) Production of benzaldehyde and benzyalcohol by the mushroom *Polyporus tuberaster* K2606. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42, 2556–2560.

Krings U., Hinz M., Berger RG. (1996) Degradation of [2H] phenylalanine by the basidiomycete *Ischnoderma benzoinum*. *Journal of Biotechnology*. 51, 123–129.

Krings U., Pilawa S., Theobald C., Berger R.G. (2001). Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus* — elucidation of metabolic pathways using [5-2H]-ferulic acid. *Journal of Biotechnology*. 85, 305–314.

Koseki T., Ito Y., Furuse S., Ito K., Iwano K. (1996). Conversion of ferulic acid into 4-vinylguaiacol, vanillin and vanillic acid in model solutions of shochu. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 82, 46-50.

Lee I., Volm T., Rosazza J. (1998). Decarboxylation of ferulic acid to 4 vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 23, 261–266.

Leresche J., Meyer H., (2006). Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research and Development*. 10, 572-580.

Lesage-Meessen L., Delattre M., Haon M., Thibault J., Ceccaldi C., Brunerie P., Asther M. (1996). A two step bioconversion process for vanillin production from ferulic acid combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Journal of Biotechnology*. 50, 107-113.

Lesage-Meessen, L., Haon, M., Delattre, M., Thibault, J.-F., Colonna Ceccaldi, B., Bruneire, P., Asther, M. (1997). An attempt to channel the transformation of vanillic acid into vanillin by controlling methoxyquinone formation in *Pycnoporus cinnabarinus* with cellobiose. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47, 393–397.

Loera O., Córdova J., (2003). Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46, 177–181.

Lomascolo A., Stentelaire C., Asther M., Lesage-Meessen L. (1999). Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends in Biotechnology*. 17, 282-288.

Lowry O.H., Rosebrough N., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.

Masuda T, Yamada K, Maekawa T, Takeda Y, Yamaguchi H. (2006). Antioxidant mechanism studies on ferulic acid: identification of oxidative coupling products from methyl ferulate and linoleate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 6069–6074.

Mathew S., Abraham E. (2006). Bioconversions of ferulic acid and hydroxycinnamic acid. *Critical Reviews in Microbiology*. 32, 115-125.

Mathew S., Abraham E., Sudheesh S. (2007). Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis. B*. 44, 48–52.

Mechichi T., Labat M., Bharat I., Patel K., Woo T., Thomas P., Garcia J. (1999). *Clostridium methoxybenzovorans* sp. nov., a new aromatic o-demethylating homoacetogen from an olive mill wastewater treatment digester. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49, 1201-1209.

Micard V., Grabber J.H., Ralph J., Renard C., Thibault J. (1997). Dehydrodiferulic acids from sugar-beet pulp. *Phytochemistry*. 44, 1365-1368.

Mitchell D., Berovic M., Krieger N. (2000). Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing. *Advances in Biochemistry Engineering Biotechnology*. 68, 61-138.

Mitchell D., Berovic M., Krieger N. (2002). Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnology Annual Review*. 8, 183-225.

Miquel E., Nissen L., Skibsted L. (2004). Antioxidant evaluation protocols: food quality or health effects. *European Food Research and Technology*. 219, 562-571.

Montiel-González A.M., Fernández F.J., Viniegra-González G., Loera O. (2002). Invertase production on solid state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 102, 63–70.

Narbad A., Gasson M. (1998). Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel Co-A dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*. 144, 1397-1405.

Nardini M., Cirillo E., Natella F., Scaccini C. (2002). Absorption of phenolic acids in human after coffee consumption. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 50, 5735-5741.

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

Nazareth S., Mavinkurve S. (1986). Degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol by *Fusarium solani*. *Journal of Microbiology*. 32, 494-497.

Oddou J., Stentelaire C., Lesage-Meessen L., Asther M., Colonna Ceccaldi B. (1999). Improvement of ferulic acid bioconversion into vanillin by use of high-density cultures of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53, 1-6.

Ou S., Kwok K. (2004). Review: Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* . 84, 1261-1269.

Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Journal of Biochemical Engineering*. 13, 1381–84.

Pascual M., Carretero M., Slowing K. Villar A. (2002). Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. *Pharmaceutical Biology*. 40, 139-143.

Peng X., Misawa N., Harayama S. (2003). Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1417–1427.

Pérez-Morales G. (2008). Producción de enzimas tipo feruloil esterasa por Fermentación en medio sólido En pulpa de café. Tesis de maestría en biotecnología UAMI.

Pieta P., Minoggio M., Bramati L. (2003). Plant polyphenols: structure, occurrence and bioactivity. *Studies in Natural Products Chemistry*. 28, 257-312.

Priefert H., Rabenhorst J., Steinbüchel A., (2001). Biotechnological production of vanillin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56, 296–314.

Rahouti M., Seigle-Murandi F., Steiman R., Eriksson K.E. (1989). Metabolism of Ferulic Acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55, 2391-2398.

Ralph J., Quideau S., Grabber J.H., Hatfield R.D. (1994). Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell walls. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*. 1, 3485–3498.

Ramachandra S., Gokare A. (2000). Biotransformation of protocatechuiv aldehyde and caffeic acid to vanillin and capsaicin in freely suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *Journal of Biotechnology* 76,137-146.

Ramirez-Martinez, J. R. (1988). Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal Science Food Agriculture*. 43, 135-144.

Ranadive A. (1992). Vanillin and Related Flavor Compounds in Vanilla Extracts Made from Beans of Various Global Origins *Journal Agriculture of Food Chemistry* 40, 1922-1924.

Rechner A., Spencer J., Kuhnle G., Hahn U., Evans C. (2001). Nobel biotransformations of the metabolism of caffeic acid derivatives in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 30, 1213-1222.

Robertson D., Williams G. (2009). Clinical translational science principles of human research. 1st Edit. Academic Press Publications.

Robinson T., Singh D., Nigam P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55, 284–289.

Rodríguez H., Curiel J.A., Landete J.M., De las Rivas B., López de Felipe F., Gómez-Cordovés C., Mancheño J.M., Muñoz R. (2009). Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 132, 79-90.

Roussos S., Aquiahuatl A., Cassaigne J., Favela E., Gutierrez M., Hanniibal L., Huerta S., Nava G., Raimbault M., Rodríguez W., Salas J.A., Sánchez R., Trejo M., Viniegra G. (1989). Detoxificación de la pulpa de café por fermentación sólida . en Memorias I Sem. Intern. Biotecnol. Agroindust. Café (ISIBAC), Roussos, Licono y Gutierrez (Eds), Xalapa México, 121-143.

Rosazza J., Huang A., Dostal L., Volm T., Rousseau B. (1995). Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant product. *Journal of Industrial Microbiology*. 15, 457-471.

Rouessac F., Roussac A. (2003). Espectroscopia de resonancia magnética nuclear en Análisis Químico. 5ª Edición. Edit. Mc Graw Hill.

Ruiz Sánchez P. (2002) Producción de cafeoil feruolil y *p*-cumaroil esterasas por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono. Tesis de maestría en biotecnología UAMI.

Sachan A., Ghosh S., Mitra A. (2006). Biotransformation of *p*-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. *Letters in Applied Microbiology*. 42, 35–41.

SAGARPA (2000). Aprovechamiento de esquilmos y subproductos en la alimentación del ganado.

Saija A, Tomaino A, Lo Cascio R, Trombetta D, Proteggente A, De Pasquale A, Uccella N, Bonin F. (1999). Feruloyl and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage, *Journal Science Food Agriculture*. 79, 476-480.

Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M.R., Lonsane B.K., Navarro J.M., Roussos S., Dufour D., Raimbault, M. (1994). On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*. 29, 13-24.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30, 3875-3883.

Schöbel B., Pollmann W. (1980). Isolation and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 35, 209-12.

Seshime Y., Praveen R.J., Funii I., Kitamoto K., (2005). Genomic evidence for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 337, 747–751.

Seyhan E. (2000). Química Orgánica . Estructura y Reactividad. Tomo 2. 1ª. Edic. Edit. Reverté

Skoog., West., Holler. (2005). Fundamentos de química analítica. 8ª. Edic. Editorial Reverté

Smith M., Weaver V., Young D., Ornston N. (2003). Genes for chlorogenate and hydroxycinnamate catabolism (*hca*) are linked to functionally related genes in the *dca-pca-qui-pob-hca* chromosomal cluster of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 524–532.

Stentelaire C., Lesage- Meessen L., Delattre M., Haon M., Sigoillot J.C., Ceccaldi C., Asther M. (1998). Short Communication: By Passing of unwanted vanillyl alcohol formation using selective adsorbents to improve vanillin production with *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 285-287.

Suezawa Y., Suzuki M. (2007). Bioconversion of Ferulic Acid to 4-Vinylguaiacol and 4- Ethilguaiacol and 4- Vinylguaiacol to 4- Ethilguaiacol by Halotolerant Yeasts Belongin to the Genus *Candida*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 71, 1058-1062.



Sutherland JB., Crawford DL., Pomentto AL., (1983). Metabolism of cinnamic acid, *p*-coumaric acid and ferulic acid by *Streptomyces setonii*. *Canadian Journal of Microbiology*. 29, 1253-1257.

Thibault J., Asther M., Colonna B., Couteau M., Duarte –Cardoso José., Faulds C., Hansen H., Kroon P., Lesage-Meessen L., Micard V., Renard C., Tuohy M., Van Hult S., Williamson G. (1999). Fungal bioconversion of agricultural by-products to vanillin. *Lebensm.-Wiss. U – Technology*. 31, 530-536.

Topakas E., Kalogeris E., Kekos D., Macris B., Christakopoulos P. (2003). Production and partial characterisation of feruloyl esterase by *Sporotrichum thermophile* in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 38, 1539-1543.

Torres y Torres J., Rosazza J. (2001). Microbial Transformations of *p*-Coumaric Acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *Journal of Natural Products*. 64, 1408-1414.

Torres-Mancera M (2008). Extracción enzimática de ácidos hidroxicinámicos presentes en la pulpa de café. Tesis de Maestría en biotecnología. UAMI.

Tovar-Castro L., García-Garibay M., Saucedo-Castañeda G. (2008). Lactase Production by Solid-state Cultivation of *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 on an Inert Support: Effect of Inoculum, Buffer, and Nitrogen Source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 151, 610–617.

Tripathi U., Rao R., Ravishankar G. (2002). Biotransformation of phenylpropanoid compounds to vanilla flavor metabolites in cultures of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochemistry*. 38, 419-426.

Tsioulpasa A., Dimoua D., Iconomoub D., Aggelis G., (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technology*. 84, 251–257.

US Patent 20060292188. Ophthalmic Solution with Flavoring Agents.

Vermerris W., Nicholson R. (2006). Classes of phenolic compounds en: Phenolic compounds Biochemistry Springer Science.

Verpoorte (2000).Secondary metabolism en Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Verpoorte R y Alferman A. Edits. Kluwer Academic Publishers. Pags- 1-29.

Waldron K.W., Parker M.L., Parr, A.J. (1997). Ferulic acid Dehydrodiferulic acids from sugar beet pulp. *Phytochemistry*. 44, 1365–1368.

Waldron K., Parker M.L., Parr A.J. (1999). Ferulic acid dehydrodimers in the cell walls of *Beta vulgaris* and their possible role in texture. *Journal of Science Food Agriculture*. 74, 221–228.

Wang W., Luo L., Yao S., Luan Z., Zhang J., Lin N. (1993). Interaction of Phenolic antioxidant and hydroxyl radicals. *Radiation Physics and Chemistry*. 42, 985-987.

Ward, O.P., Qin, W.M., Dhanjoon, J., Ye, J., Singh, A., (2006). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. 58, 1–75.

Wong D. (1995). Química de los alimentos: Mecánica y teoría. 2ª. Edición. Edit. Acribia. Zaragoza España.

*ANEXOS*

## ANEXOS

## ANEXO 1. Publicaciones y trabajos presentados en congresos

Bioresource Technology 101 (2010) 4721–4724



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biortech](http://www.elsevier.com/locate/biortech)

Short Communication

Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*Itzamná Baqueiro-Peña<sup>a</sup>, Gabriela Rodríguez-Serrano<sup>a</sup>, Eduardo González-Zamora<sup>b</sup>, Christopher Augur<sup>c</sup>, Octavio Loera<sup>a</sup>, Gerardo Saucedo-Castañeda<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Biotechnology, Autonomous Metropolitan University, Campus Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina C.P. 09340, Iztapalapa, DF, Mexico<sup>b</sup> Department of Chemistry, Autonomous Metropolitan University, Campus Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina C.P. 09340, Iztapalapa, DF, Mexico<sup>c</sup> Laboratoire IRD-IMEP, Université Paul Cézanne, Faculté des Sciences et Techniques de St. Jérôme, 13397 Marseille Cedex 20, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 6 October 2009

Received in revised form 14 January 2010

Accepted 20 January 2010

Available online 11 February 2010

## Keywords:

*Aspergillus niger*

Ferulic acid

4-Vinylguaiacol

Vanillic acid

## ABSTRACT

Ferulic acid biotransformation has a number of interesting industrial uses. Ferulic acid biotransformation by the wild strain *Aspergillus niger* C28B25 and a diploid strain DAR2, obtained by parasexual recombination, was studied. The wild strain of *A. niger* C28B25 biotransforms ferulic acid to vanillic acid (VA); while the diploid strain DAR2 preferentially decarboxylates ferulic acid to 4-vinylguaiacol (4VG). The latter was identified by mass spectroscopy, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy, and quantified by HPLC. The diploid strain *A. niger* DAR2 and the wild strain showed a ferulic acid conversion of 64% and 36%, respectively. Molar yields show that the formation of 4VG was preferred, being as much as 4.4 times higher than the formation of VA in diploid strain cultures. Differential regulation of enzymes involved in the biotransformation of ferulic acid may explain the accumulation of 4VG by diploid DAR2. This strain produced both 4VG and VA.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Ferulic acid (FA) is one of the most abundant phenolic compounds, it is well known for its antioxidant properties; it occurs in plant cellular walls either freely or linked covalently to biopolymers (Mathew and Abraham, 2006). The compound 4-vinylguaiacol (4VG) is a particularly valuable product in the food industry, for example, being used as flavouring in beers such as Belgian wheat and German Rauch (Mathew et al., 2007). It is also used as a starting material for the manufacture of chemical commodities such as vanillin, and in the ophthalmic field for preparing a solution containing flavouring agents (US Patent 20060292188). The aim of this work was to study the biotransformation of FA by the wild and the diploid strain of *Aspergillus niger* C28B25. The latter had been obtained previously by parasexual recombination (Montiel-González et al., 2002).

## 2. Methods

## 2.1. Microorganism

Two strains of *A. niger* were used: the wild strain C28B25 and diploid strain DAR2. The wild and diploid strains of *A. niger* were

maintained in potato dextrose agar (PDA), and in Czapek Dox agar (Difco), respectively.

## 2.2. Inoculum preparation

Spore suspensions for both strains were obtained from cultures that had been incubated for 96 h at 30 °C in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of corresponding maintenance agar. The spores were counted using a Neubauer hemacytometer and the inoculum was adjusted to 10<sup>7</sup> spores/ml.

## 2.3. Cultures for ferulic acid biotransformation

The composition of the culture medium was as follows (g/l): 3, sucrose; 3, yeast extract; 3, NaNO<sub>3</sub>; 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.5, MgSO<sub>4</sub> and 0.5, KCl. FA was first diluted in methanol and filtered through a 0.20 μm Millipore membrane, and added to reach a final concentration of 800 mg/l. Fermentations were carried out in 35 ml glass bottles containing 10 ml of broth. Incubation was realized at 30 °C for 120 h at 100 rpm. Samples were taken in duplicate every 12 h, mycelium was removed by filtration and biomass quantified by gravimetry. Aliquots were analyzed for FA, products, sugar concentrations and pH.

The molar yield of product formation to FA consumed was expressed as:

\* Corresponding author. Tel.: +52 (55) 5804 4999; fax: +52 (55) 561 2 8083.  
E-mail address: [saucedo@xanum.uam.mx](mailto:saucedo@xanum.uam.mx) (G. Saucedo-Castañeda).



$$Y = \frac{P_f - P_0}{FA_0 - FA_f}$$

where  $P_0$  and  $P_f$  are the initial and final molar concentration of the product respectively.  $FA_0$  and  $FA_f$  are the initial and final concentration, respectively. FA conversion (%) was expressed as follows:

$$\text{FA conversion (\%)} = \frac{FA_0 - FA_f}{FA_0} \times 100$$

#### 2.4. Analytical techniques

##### 2.4.1. Preparative chromatography (PC) and purification of compounds

Cultures were carried out in 500 ml Erlenmeyer flasks with 300 ml of medium for product purification and identification; cell-free samples were obtained at 120 h. Samples were extracted three times with chloroform, and then the solvent was removed under vacuum at 40 °C. Extracts were resuspended in 2 ml of methanol. PC of extracts was carried out on a silica glass plate using toluene, 1,4-dioxane, acetic acid (90:25:4) as the mobile phase (Hopper and Mahadevan, 1997) fractions were analyzed by HPLC and characterized by GC-MS and NMR.

##### 2.4.2. Phenolic and sugar analysis by HPLC

Phenolic and sugar content were analyzed by HPLC as described by Barghini et al. (2007) and Tovar-Castro et al. (2008), respectively.

##### 2.4.3. NMR

The NMR assays were recorded on a Bruker DMX 500 MHz spectrometer (Karmakar et al., 2000). Chemical shifts values (ppm) and coupling constants ( $J$ ) were reported in hertz (Hz):  $^1\text{H}$  NMR:  $\delta$  (ppm) 6.93 (d, 1H,  $J = 1.9$  Hz,  $H_a$ ), 6.91 (ddd, 1H,  $J_1 = 0.5$ ,  $J_2 = 1.9$ ,  $J_3 = 8.0$  Hz,  $H_b$ ), 6.86 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz,  $H_c$ ), 6.63 (dd, 1H,  $J_1 = 10.8$ ,  $J_2 = 17.6$  Hz,  $H_d$ ), 5.67 (br s, 1H, OH), 5.58 (dd, 1H,  $J_1 = 0.9$ ,  $J_2 = 17.5$  Hz,  $H_e$ ), 5.12 (dd, 1H,  $J_1 = 0.9$ ,  $J_2 = 10.8$  Hz,  $H_f$ ), 3.90 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 146.5 (C-3-Ar), 145.63 (C-4-Ar), 136.62 (C-7), 130.27 (C-1), 120.05 (C-6), 114.34 (C-5), 111.44 (C-8), 107.99 (C-2), 55.56 (C-9).

##### 2.4.4. GC-MS analysis

GC coupled to MS was performed and results were interpreted according to the corresponding decomposition patterns. GC-MS ( $m/z$ ): 150 ( $\text{M}^+$ ), 135 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ ), 107 ( $\text{M}^+ - \text{CH}_3$  and  $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$ ) and 77 (Huang et al., 1993).

### 3. Results and discussion

Fig. 1 shows time course concentrations of FA, VA and 4VG for the wild and diploid strain of *A. niger* C28B25. Table 1 shows the conversion and yield values obtained for both strains after 5 days of cultivation.

Small changes in pH were observed: pH varied from 6.6 to 7.2, and 6.6 to 7 at the end of the cultures, for the wild and DAR2 strain, respectively. Sugar was totally consumed after 24 h, and higher values of biomass were reached by strain DAR2 (45 mg/ml) in comparison to the wild strain (35 mg/ml), suggesting a higher tolerance of DAR2 strain to FA toxicity (Tsioulpasa et al., 2002).

A FA conversion of 36% was observed (Table 1) and a maximal VA concentration of 137 mg/l was obtained, giving a yield of 57% for the wild strain. A similar concentration of VA was found by Ghosh et al. (2006), using *Paecilomyces variotii* MTCC 6581; after 16 days of cultivation, the productivity (mg/l/d) was almost three times higher in the current study for the wild strain.

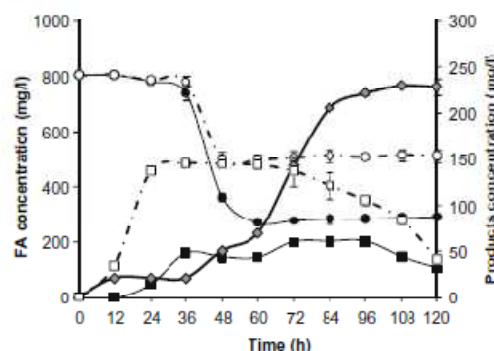


Fig. 1. Transformation of ferulic acid into vanillic acid and 4-vinylguaiacol by fungal strains *A. niger* C28B25 (wild type) and *A. niger* DAR2 (diploid). (○) ferulic acid *A. niger* C28B25, (●) ferulic acid *A. niger* DAR2, (□) vanillic acid *A. niger* C28B25, (■) vanillic acid *A. niger* DAR2, (◆) 4-vinylguaiacol *A. niger* DAR2.

Table 1

FA conversion and yield for the wild type strain and the DAR2 strain at 120 h of incubation.

Conversion	Wild type	DAR2
FA conversion (%)	36	64
Yield 4VG/FA (M/M)	ND	57
Yield VA/FA (M/M)	57	13

4VG: 4-Vinylguaiacol; FA: ferulic acid and VA: vanillic acid.  
ND: Not detected.

Low concentrations of methoxyhydroquinone for both strains were detected as well as other products that could not be identified and 15 mg/l of vanillyl alcohol was detected in DAR2 cultures. The main difference in the FA biotransformation was that the diploid strain DAR2 produced both 4VG and VA, while the wild strain produced mainly VA. Conversion of FA into products was 1.8 times higher in the diploid strain (64%) in comparison with the wild strain (36%). Molar yields show that the formation of 4VG was preferred, being as much as 4.4 times higher than the formation of VA in diploid strain cultures.

Biotransformation of FA by the diploid strain suggests a non-oxidative decarboxylation into 4VG, and this was reduced into vanillyl alcohol and methoxyhydroquinone. On the other hand, the wild strain biotransforms FA via a propenoic chain degradation to VA with subsequent oxidative decarboxylation into methoxyhydroquinone (Fig. 2). This suggests that the diploid strain biotransformed FA in the same way as *Paecilomyces variotii* or *Pestalotia palmarum* (Priefert et al., 2001). Although vanillin was not detected, this might be because vanillin is usually found at a low concentration and is rapidly metabolized (Karmakar et al., 2000).

Decarboxylation of FA could be part of a detoxification system to maintain the level of inhibitory compounds under a threshold concentration. A similar mechanism has been observed in the secondary metabolism, in particular in the phenylpropenoic acid pathway (Seshime et al., 2005).

Studies regarding the enzymes involved in decarboxylation of FA to 4VG have been performed mainly in bacteria and yeasts (Priefert et al., 2001). High concentrations of 4VG were obtained in *Bacillus coagulans* BK07 (908 mg/l) or *Debaryomyces hansenii* (1470 mg/l) cultures by Karmakar et al. (2000) and Mathew et al. (2007), respectively.

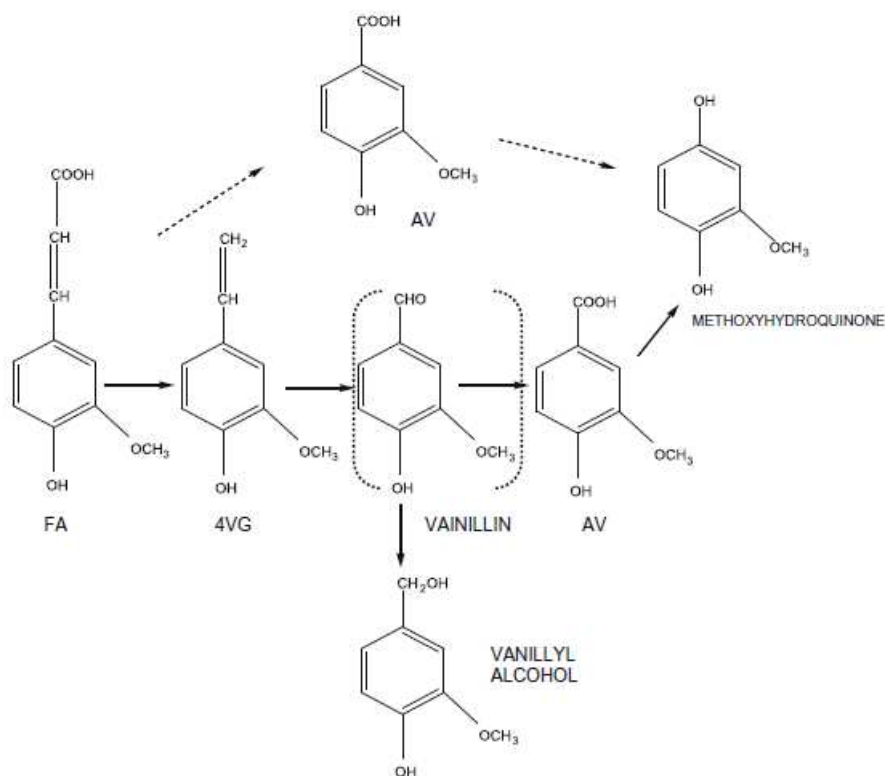


Fig. 2. FA biotransformation by strains *A. niger* C28B25 (dashed arrows) and DAR2. Dashed brackets indicate postulated product.

*A. niger* have been reported on FA biotransformation (Ward et al., 2006), nevertheless studies conducted on fungus regarding the enzymes involved in decarboxylation of FA to 4VG, are scatter. Deregulation of enzyme production has been reported for the diploid strain DAR2, used in this work, which was able to produce higher amounts of invertase and more rapidly in comparison to the wild type strain *A. niger* C28B25 (Montiel-González et al., 2002). In fact, the diploid strain showed variations in the proteins that regulate the expression of various hydrolytic enzymes (Loera and Córdova, 2003; Montiel-González et al., 2002). Accordingly, the differential regulation of enzymes involved in the biotransformation of FA may explain the accumulation of 4VG by the diploid strain, which could be advantageous for the formation of 4VG in a potential straightforward process. It is worth mentioning that the diploid strain is classified as a GRAS and thus it can be used to obtain 4VG for human consumption.

#### 4. Conclusions

The wild strain of *A. niger* C28B25 biotransforms FA via a propenoic chain degradation to VA, with a lower FA conversion. The biotransformation of FA to 4VG by the diploid strain DAR2, preferentially followed the non-oxidative decarboxylation pathway, which could be advantageous for the formation of 4VG in a straightforward process. 4VG was confirmed by preparative chromatography techniques and identified by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR and GC-MS. Differential regulation of the enzymes involved in the biotransformation of FA may explain the accumulation of 4VG by the diploid strain.

#### Acknowledgements

I.B.-P. is grateful to CONACyT, Mexico, for a PhD scholarship and G Trejo for technical assistance. This work is dedicated to the memory of Christopher Augur.

#### References

- Barghini, P., Di Gioia, D., Fava, F., Ruzzi, M., 2007. Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions. *Microbial Cell Fact.* 6, 13.
- Ghosh, S., Sachan, A., Mitra, A., 2006. Formation of vanillic acid from ferulic acid by *Paecilomyces variotii* MTCC 6581. *Curr. Sci.* 90, 825–829.
- Hopper, W., Mahadevan, A., 1997. Degradation of catechin by *Bradyrhizobium japonicum*. *Biodegradation* 8, 159–165.
- Huang, Z., Dostal, L., John, P., Rosazza, N., 1993. Mechanisms of ferulic acid conversions to vanillic acid and guaiacol. *J. Biol. Chem.* 268, 23954–23958.
- Karmakar, B., Vohra, R.M., Nandanwar, H., Sharma, P., Gupta, K.G., Sobti, R.C., 2000. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *J. Biotechnol.* 80, 195–202.
- Loera, O., Córdova, J., 2003. Improvement of xylanase production by a parasexual cross between *Aspergillus niger* strains. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 46, 177–181.
- Mathew, S., Abraham, E., 2006. Bioconversions of ferulic acid and hydroxycinnamic acid. *Crit. Rev. Microbiol.* 32, 115–125.
- Mathew, S., Abraham, E., Sudheesh, S., 2007. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinylguaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *J. Mol. Catal. B* 44, 48–52.
- Montiel-González, A.M., Fernández, F.J., Viniestra-González, G., Loera, O., 2002. Invertase production on solid state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102, 63–70.
- Priefert, H., Rabenhorst, J., Steinbüchel, A., 2001. Biotechnological production of vanillin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 296–314.
- Seshime, Y., Praveen, R.J., Funii, I., Kitamoto, K., 2005. Genomic evidence for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 337, 747–751.

Tovar-Castro, L., García-Garibay, M., Saucedo-Castañeda, G., 2008. Lactase production by solid state cultivation of *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 on an inert support: effect of inoculum, buffer and nitrogen source. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 151, 610–617.

Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., Aggeis, G., 2002. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresour. Technol.* 84, 251–257.

US Patent 20060292188. Ophthalmic Solution with Flavoring Agents.

Ward, O.P., Qin, W.M., Dhanjoo, J., Ye, J., Singh, A., 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.* 58, 1–75.

Con la información obtenida a lo largo de este proyecto, se presentaron tres trabajos en categoría de poster:

- XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, junio 2007, Morelia Michoacán. Selección de hongos filamentosos con actividad para transformar compuestos fenólicos.
- XXIV International Conference on Polyphenols, julio 2008, Salamanca España. Microbial biotransformation of ferulic acid to vanillic acid: Enzymatic analyses.
- XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, junio 2009, Acapulco-Guerrero. Biotransformación fúngica del ácido clorogénico: una alternativa para la producción de un antioxidante natural.



## SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS FILAMENTOSOS CON ACTIVIDAD PARA TRANSFORMAR COMPUESTOS FENÓLICOS

Itzamná Baqueiro-Peña, Gabriela Rodríguez-Serrano, Eduardo González-Zamora<sup>1</sup>, Christopher Augur<sup>2</sup> y Gerardo Saucedo-Castañeda

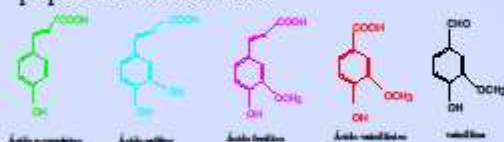
Depto. de Biotecnología, <sup>1</sup>Depto. de Química, UAM-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, México D.F. 09340 MÉXICO, Tel-Fax: 58 04 65 54, e-mail: [saucedo@xanum.uam.mx](mailto:saucedo@xanum.uam.mx)

<sup>2</sup>IRD-IMEP Université Paul Cézanne, 13397, Marseille -Francia

**Palabras clave:** Ácidos hidroxycinámicos, antioxidantes, biotransformación

**Introducción.** Las propiedades benéficas de los antioxidantes han sido ampliamente reconocidas en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética. Químicamente son muy cercanos a algunos de los compuestos fenólicos. Existen reportes de la biotransformación de los compuestos fenólicos, en particular, el ácido ferúlico. Se ha reportado la reducción del ácido ferúlico por especies de *Trametes* (4). *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 biotransforma el ácido ferúlico hasta ácido vainillínico, el cual es reducido hasta vainillina (1).

El objetivo de este estudio es seleccionar hongos filamentosos capaces de transformar ácidos fenólicos hasta ácido vainillínico y vainillina, para lo cual se propone una ruta metabólica.



**Materiales y Métodos.** Se realizó la selección de 19 cepas fúngicas de la colección UAMI-IRD. Se utilizaron 4 compuestos fenólicos: ácido p-cumárico, ácido caféico, ácido ferúlico, ácido vainillínico. La composición del medio de cultivo fue (g/l): Sacarosa 3, NaNO<sub>3</sub> 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub> 0.5, KCl 0.5, extracto de levadura 3 y compuestos fenólicos 200 y 800 mg/l. Se colocaron 10 ml de medio de cultivo en tubos de boca ancha, se agregaron 200 µl de compuesto fenólico a la concentración correspondiente (200 y 800 mg/l) y 25 µl de suspensión de esporas. Los tubos se incubaron a 30°C, con agitación constante de 100 rpm por 72 horas. Después de 72 horas, el sobrenadante fue analizado por cromatografía en capa fina (3) y HPLC (2). Se construyó una curva patrón de los 4 compuestos fenólicos por HPLC. El criterio de selección que se utilizó fue la capacidad de los microorganismos de biotransformar los compuestos fenólicos de acuerdo a la ruta propuesta.

**Resultados y discusión.** El análisis cromatográfico mostró que existen cepas con la capacidad de degradar los compuestos fenólicos (cuadro 1). Las cepas C28312, C17309, V26316, C16310 y Ad96-4, convirtieron el ácido ferúlico (800 mg/l) a ácido vainillínico. La cepa C16310 generó concentraciones de ácido vainillínico de 0.35 mg/l.

Las cepas DAR 2, Ad96-4, V26316 y la cepa C17309, produjeron compuestos desconocidos que están presentes en la vía propuesta, dichos compuestos serán identificados por resonancia magnética nuclear. Al usar el ácido caféico (800 mg/l), las cepas V26316 y C23308, mostraron la capacidad de metilar el ácido caféico para dar origen al ácido ferúlico, lo cual se ve claramente en el valor de Rf del ácido ferúlico.

**Cuadro 1.** Biotransformación de los ácidos hidroxycinámicos por cepas de hongos.

Cepa	Sustrato (mg/l)	Producto	Rf de los compuestos encontrados
C23308	Ácido Caféico 800	Ácido Ferúlico	0.62
C28312	Ácido Ferúlico 800	Ácido Vainillínico	0.72
C17309	Ácido Ferúlico 800	Ácido Vainillínico	0.72
		Desconocido	0.95
	p-cumárico 800		
V26316	Ácido Ferúlico 800	Ácido Vainillínico	0.72
	Ácido Caféico 800	Ácido Ferúlico	0.62
V12307	Ácido Caféico 200	Desconocido	0.79
C16310	Ácido Ferúlico 800	Ácido Vainillínico	0.72
Ad96-4	Ácido Ferúlico 800	Desconocido	0.86
	Ácido Caféico 200	Desconocido	0.79
DAR 2	Ácido Ferúlico 800	Desconocido	0.95

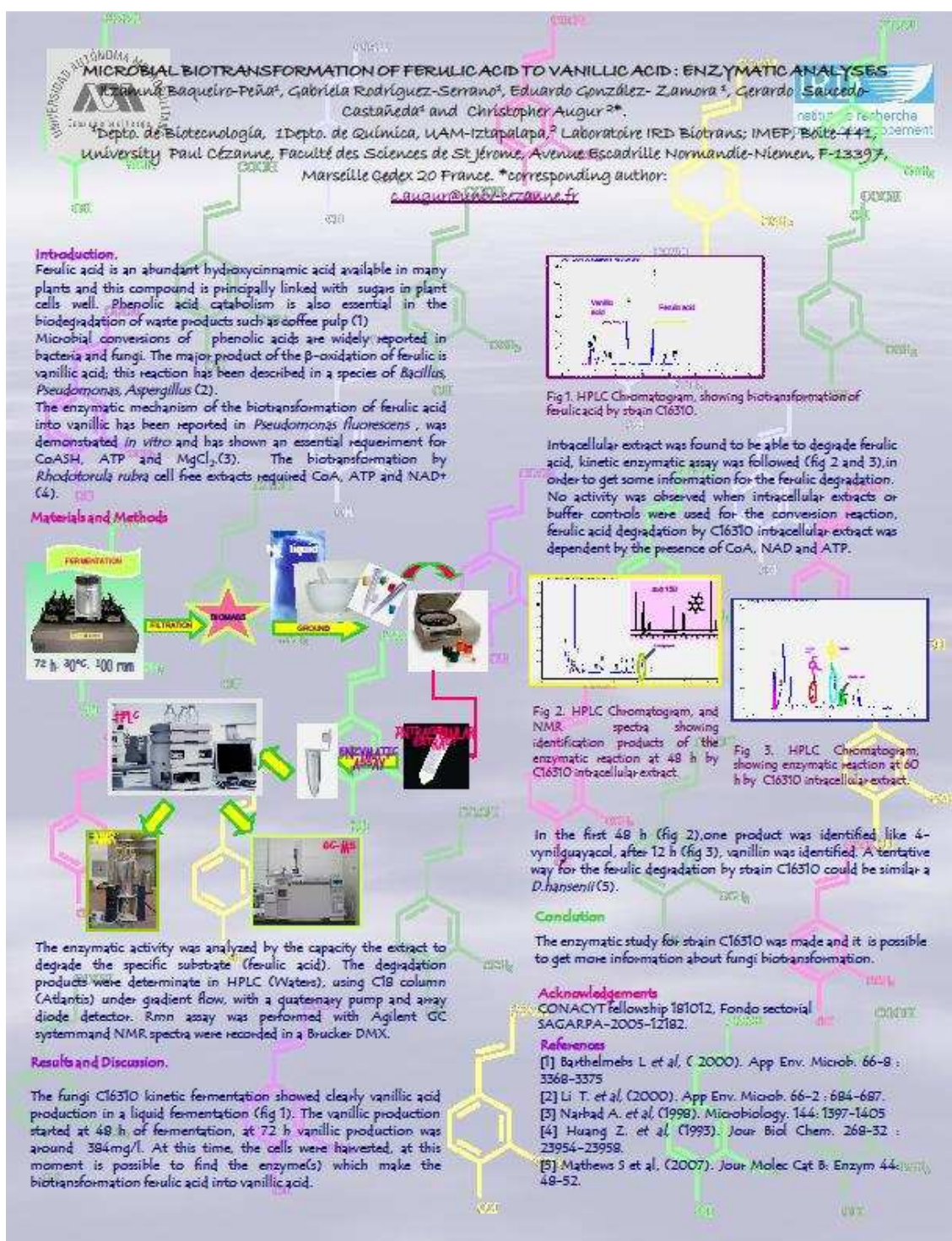
**Conclusión.** De las 19 cepas probadas, se encontró que 8 pueden transformar los compuestos fenólicos en los intermediarios de la ruta metabólica propuesta para la biotransformación y serán evaluadas en medio sólido sobre diferentes ácidos fenólicos.

**Agradecimientos.** CONACYT, Fondo sectorial SAGARPA-2005-12182.

### Bibliografía

- Falconnier B., Lapierre C., Lesage-Meessen L., Yonnet G., Brunerie P., Ceccaldi-Colona B., Corrieu G. and Asther M. (1994). Vainillin as a product of ferulic acid biotransformation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* I-937: Identification of metabolic pathways. *Journal of Biotechnology* 37: 123-132.
- Hedge S., Cavita S., Varadaraj M.C. and Muralikrishna. 2006. Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid by *A. niger* CFR 1105. *Food Chemistry* 96: 14-19.
- Hooper W. and Mahadevan A. 1997. Degradation of catechin by *B. japonicum*. *Biodegradation* 8: 159-165.
- Lomascolo A., Stentelaire C., Asther M. and Lesage-Meessen L. (1999). Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Trends Biotechnology* 17: 282-288.







## BIOTRANSFORMACIÓN FÚNGICA DEL ÁCIDO CLOROGENICO: UNA ALTERNATIVA PARA LA PRODUCCIÓN DE UN ANTIOXIDANTE NATURAL

Itzamná Baqueiro-Peña, Gabriela Rodríguez-Serrano, Eduardo González-Zamora<sup>1</sup>, Christopher Augur<sup>1</sup> y Gerardo Saucedo-Castañeda.

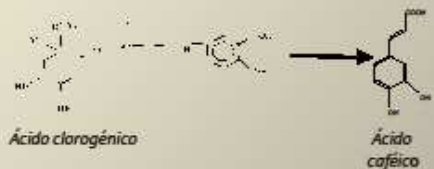
Depto. de Biotecnología, <sup>1</sup>Depto. de Química, UAM-Iztapalapa, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, Iztapalapa, México D.F. 09340  
Tel-Fax: 58 04 65 54, e-mail: [saucedo@xanum.uam.mx](mailto:saucedo@xanum.uam.mx), <sup>2</sup>IRD, Marsella-Francia

Palabras clave: *ácido clorogénico, antioxidante, biotransformación*

**Introducción.** El ácido clorogénico es un compuesto que se encuentra en altas concentraciones en diversas bebidas y alimentos como café, peras, sidra, entre otros. En la pulpa de café, este compuesto se reporta como el mayor constituyente de los ácidos hidroxicinámicos 40%(1). El ácido caféico ha demostrado alto poder antioxidante *in vitro*. El uso de los ácidos hidroxicinámicos como antioxidantes naturales se ha incrementado en los últimos años. Estos compuestos previenen la rancidez oxidativa en alimentos e *in vivo* previenen daños relacionados con la oxidación de las células como el cáncer y enfermedades vasculares. En este estudio proponemos la biotransformación del ácido clorogénico presente en la pulpa de café, para obtener ácido caféico.

**Metodología.** Se utilizó la cepa fúngica C23308 de la colección UAM-IRD. Se empleó el ácido clorogénico (Sigma), como standard y se realizaron las cinéticas en cultivo líquido. La composición del medio de cultivo fue (g/l): Sacarosa 3, NaNO<sub>3</sub> 3, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub> 0.5, KCl 0.5, Extracto de levadura 3 y ácido clorogénico (0.8g/l). El nivel de inóculo fue de 10<sup>6</sup> esporas/ml. Los productos de la fermentación fueron analizados por HPLC (2).

Para la biotransformación se propone la siguiente reacción:



**Resultados y discusión.** El análisis cromatográfico demostró que la cepa C23308 biotransformó de manera eficiente el ácido clorogénico a ácido caféico (Figura 1), se observó una conversión mayor (55%) a las 36 h de fermentación. Durante el estudio se encontró una concentración muy baja del ácido protocateico como producto de la descarboxilación del ácido caféico; es importante notar que el compuesto de interés se acumula durante la fermentación.

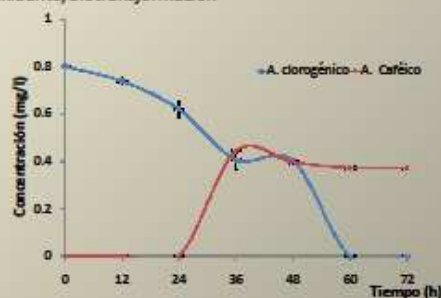


Fig. 2. Biotransformación del ácido clorogénico a ácido caféico en un cultivo líquido de la cepa fúngica C23308.

Cuadro 1. Resultados importantes de la biotransformación del ácido clorogénico en ácido caféico

Producto (g/l)	Conversión (%)	Biomasa (mg/10 mL)	pH
0.445 ± 0.02	55.3	35.9 ± 4.5	8.1

**Conclusiones.** La biotransformación del ácido clorogénico por la cepa C23308 dió como resultado un compuesto con alto poder antioxidante, el ácido caféico

Agradecimiento. CONACYT.

Bibliografía.

- Benoit I, Navarro D, Marnet N, Rakotomanomana N, Lesage-Meessen L, Sigoillot JC, Asther M, and Asther M. (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Research* (2006)
- Hedge S., Cavita S., Varadaraj M.C. and Muralikrishna. 2006. Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid by *A. niger* CFR 1105. *Food Chemistry* 96: 14-19.



## ANEXO 2. Identificación de cepas fúngicas

### Secuencias ITS1-5.8S-ITS2

#### C23308 *Aspergillus niger* ITS

GAGTCGGGGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGT  
TGCTTCGGCGGGCCCGCAAAGACGGCCCGCGGGGGGGCGCCTCTGCC  
CCCCGGCCCGTCCAGCCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCG  
TGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGAT  
CTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATG  
TGAATTGCAGAATCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC  
CCCTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGTGCCCCAA  
GCCCGGCTTGTGTGTTGGTTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGACGGGCC  
GAAAGGCAGCGCGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGT  
CACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATT  
TTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAASCAT  
ATCAATAAGCGGAGGAA

#### C16310 *Aspergillus niger* ITS

AGTGCGGGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTTG  
CTTCGGCGGGCCCGCAAAGGAGGCCCGCGGGGGGGCGCCTTTGCCCC  
GGCCCGTCCCGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTGC  
AGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCTC  
TTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGA  
ATTGCAGAATCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC  
TGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCC  
CGGCTTGTGTGTTGGTTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGACGGGCCGAA  
AGGCAGCGCGGCACCCGCTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTAC  
ATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTTTT  
CCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATC  
AATAAGCGGAG

#### C17309 *Aspergillus niger* ITS

AAGTCGGGGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTGTACCCTGTT  
GCTTCGGCGGGCCCGCAAAGGCGGCCCGCGGGGGGGCGCCTCTGCCCC  
CGGGCCCGTCCCGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTG  
CAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAAACTTTCAACAATGGATCT  
CTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTG  
AATTGCAGAATCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCC  
CTGGTATTCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGC  
CCGGCTTGTGTGTTGGTTCGCCGTCCCCCTCTCCGGGGGACGGGCCGAA  
AAGCAGCGCGGCACCCGCTCCSATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCA  
CATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACCATTCTT  
TCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATAT  
CATTAAGCGGAGGAA

#### V26316 *Penicillium crustosum* ITS

GTGGAGGGCCCTCTGGGGTCAACCTCCACCCGTGTTATTTTACCTTGT  
TGCTTCGGCGGGCCCGCAAAGGCGGCCCGCGGGGGGGCTTACGCCCCGG  
GCCCGCCAGAAAGGAGCCCTCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTG  
AGTGAATAATAAATTTTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCC  
GGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGAAA  
TTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCC  
GGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTG  
TGTGGGGCCCGTCCCCGATCTCCGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGG  
CGGCACCCGCTCCGCTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCAACCCGCTGT  
AGGCCCGGCCGCGCTTGCAGATCAACCCAAATTTTTATCCAGGTTGACC  
TCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAG  
GAA

C28312 *Aspergillus niger* ITS

GAAGCGCTGAACTCGAGTCGGGTCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTC  
TATTGTACCCTGTGCTTCGGCGGGCCCGCGCTTGTTCGGCCCGGGGG  
GGCGCCTCTGCCCCCGGGCCCGTGCCTCGCGGAGACCCCAACACGAACA  
CTGTCTGAAAGCGTGCAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACT  
TTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT  
GCGATAACTAATGTGAATTCGAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTAA  
CGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCA  
TTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCCTCTCCG  
GGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGCGGCACCGCTCCGATCCTCGAGCG  
TATGGGGCTTTGTACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCTGCCGACGT  
TTTCCAACCATTCTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCCG  
TGAACTTAAGCATATCAATACCGGAGGAATT

## Secuencias TUBULINA

## C23308 TUBULINA

GWRGRMRGAMCAGGMCTACTTCGTCGAGTGGATCCCCAACACATCCAG  
ACCGCCCTGTGCTCCATTCCTTTTGGAGTCTCAAGATGTCCTCCACCTTC  
ATCGGTAACCTCCACTAACAAASCAGAGGCTCTACAGAGGAAYSKKCKTWCT  
CKRCCTCMRTKSWCKRWKCGKCGKYTAYSACAGR

<u>XM_001392399.1</u>	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 hypothetical protein (An08g03190) partial mRNA	<u>154</u>	154	52%	1e- 34	94%
-----------------------	---	------------	-----	-----	-----------	-----

## C16310 TUBULINA

CRRCGRTACAGACCTACTTCGTCGAGTGGATCCCCAACACATCCAGACC  
GCCCTGTGCTCCATTCCTTTCGAGGWMTCAGATGTCCTTACCTTCATC  
GGTAACTCCACCAARSSGAGGCACRRGGAKAAACGGGGYGGYSGYCG  
YTKWSYWWCGKYGSGCGGWSKSSYTS GKAG

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
<b>XM_001392399.1</b>	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 hypothetical protein (An08g03190) partial mRNA	158	158	57%	1e- 35	93%

## C17309 TUBULINA

TGRCATAMCAGACCTACTTCGTCGAGTGGATCCCCAACACATCCAGACC  
GCCCTGTGCTCCATTCCTCCCGTGGWTCAGATGTCCTCCACCTTCAT  
CGGTAACCTCCMCCYCCATCCAGGAGCTCTACGAGAAAYWYSRKKCMTTA  
TTTTTTTYCKCTTCWCRCWASWAAGTRTTWAGAAA

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<b><u>AM270165.1</u></b>	<i>Aspergillus niger</i> contig An08c0100, complete genome	<u>209</u>	209	63%	3e-51	97%

## C28312 TUBULINA

GYTRTCGTTYTAGRCATMYTCWGWCGAGTGGATCCCAACAACATCCWGAC  
CGCCCTGTGCTCCATTCCCTGCGAGARGCRSAAGATGTCTCCACCTTCAT  
CGGTAACCTGACTGACCATGAGCTCTTCAAKACAGYSWCGAYSWTRTTTCT  
TTCTRRYYTSRITYMCTMTCCWGWTTTCYTRTAGAGMTKTGGCGTGSMTSC  
TKTGTTSGWCAMCTCMTCKSWGYGTTWMMYMCRTAKMCCCAMCTC

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<b><u>AM270165.1</u></b>	<i>Aspergillus niger</i> contig An08c0100, complete genome	<u>108</u>	108	34%	1e-20	88%

## V26316 TUBULINA

CRRMRTACCAGTRCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAACGTCCAGACCGCTCTGTGCTCCGTTCCCTCGAGGCCTMAAGATGTCT  
TCCACCTTCGTTGGTAACTCCWTYCYCATWSARGAGCTCTTCAGAGAAAATSYTTTYSKSKTKTSMTTAMTTTTTYTTSTKTCYKT  
KGYATWKRRRRRRRG

Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
<b><u>FJ012876.1</u></b>	<i>Penicillium polonicum</i> isolate 1892 beta-tubulin gene, partial cds	<u>161</u>	161	54%	8e-37	94%
<b><u>FJ012871.1</u></b>	<i>Penicillium expansum</i> isolate Exp1895 beta-tubulin gene, partial cds	<u>161</u>	161	54%	8e-37	94%
<b><u>AY654876.1</u></b>	<i>Penicillium melanoconidium</i> isolate IMI 321503 beta-tubulin gene, partial sequence	<u>161</u>	161	54%	8e-37	94%
<b><u>AY654875.1</u></b>	<i>Penicillium commune</i> isolate NRRL 890 beta-tubulin gene, partial sequence	<u>161</u>	161	54%	8e-37	94%
<b><u>AY654874.1</u></b>	<i>Penicillium cyclopium</i> isolate NRRL 1888 beta-tubulin gene, partial sequence	<u>161</u>	161	54%	8e-37	94%
<b><u>AY654873.1</u></b>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> isolate NRRL 971 beta-tubulin gene, partial sequence	<u>161</u>	161	54%	8e-37	94%

### ANEXO 3. Curvas patrón de concentración de compuestos fenólicos.

La concentración e los compuestos fenólicos del estudio de la biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos se realizó por la técnica de HPLC, por lo que elaboraron las curvas patrón de concentración de 0-500 mg/l (Figura A.3)

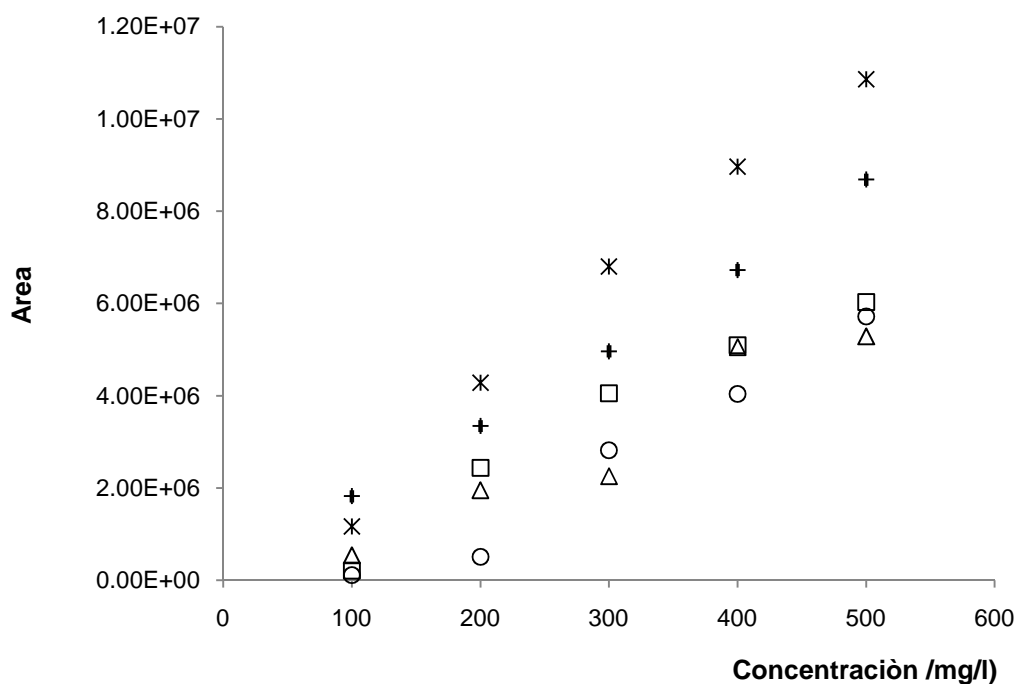


Figura A.3. Curvas patrón de concentración de los compuestos fenólicos. Ácido caféico (+), ácido p-cumárico ( $\Delta$ ), ácido clorogénico (\*), ácido ferúlico ( $\circ$ ), ácido vainillínico ( $\square$ ).

En la figura A3 se aprecia que las curvas siguen la ley de Lambert –Beer que dice que la absorbancia es directamente proporcional a la concentración. A partir de las regresiones lineales de la curvas, se determinaron los coeficientes e la regresión para cada curva (Tabla A.3).

Tabla A.3. Coeficientes de la regresión lineal de las curvas de concentración de compuestos fenólicos

Compuesto fenólico	Pendiente	Ordenada al origen	R <sup>2</sup>
Ácido caféico	536459	- 2 x 10 <sup>7</sup>	0.980
Ácido <i>p</i> -cumárico	620465	-1 x 10 <sup>7</sup>	0.987
Ácido clorogénico	202704	- 7 x 10 <sup>6</sup>	0.978
Ácido ferúlico	12034	-806088	0.990
Ácido protocatecóiico	26764	-235996	0.998
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	14428	4726.6	1
Ácido vainillínico	6738	-98839	0.990
Alcohol vainillílico	2 x 10 <sup>7</sup>	-16836	0.994

#### ANEXO 4. Curvas patrón de concentración de azúcares

La concentración e los diferentes azúcares de los extractos de biotransformación se determinaron con la técnica de HPLC, por lo que se elaboraron curvas patrón de concentración en un rango de 0- 10 g/l. Las curvas s e muestran en la figura A.4.

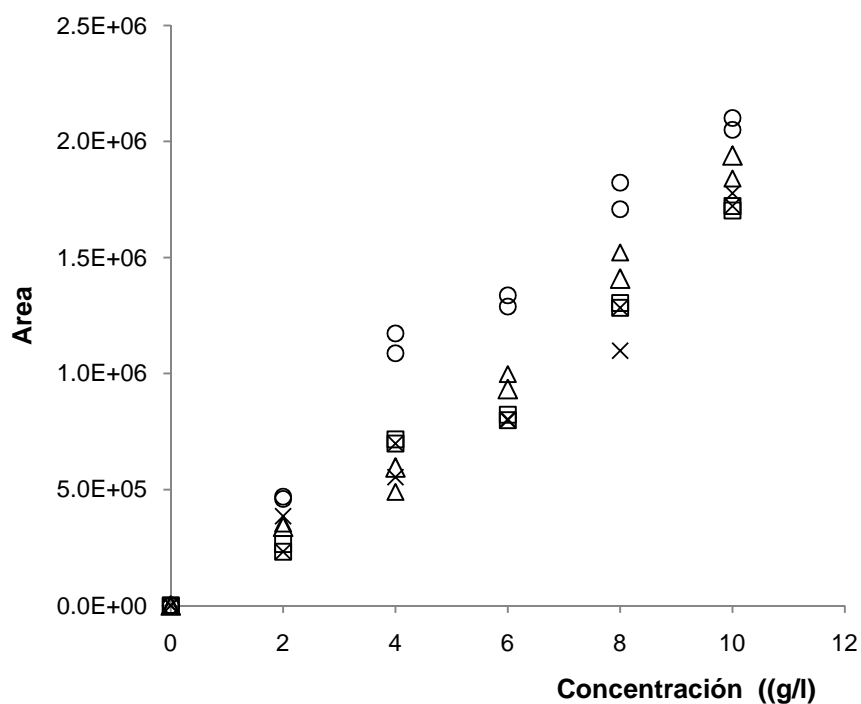


Figura A.4. Curvas patrón de concentración de azúcares. Sacarosa( $\square$ ), maltosa( $\times$ ), glucosa( $\circ$ ), fructosa( $\Delta$ ).

Se determinaron los coeficientes de la correlación lineal a partir de las curvas patrón de concentración de azucares (Tabla A.4)

Tabla A.4. Coeficientes de regresión de las curvas patrón de concentración de azucares.

Azúcar	Pendiente	Ordenada al origen	$R^2$
Sacarosa	168533	-47376	0.980
Maltosa	145404	12741	0.988
Glucosa	206059	91499	0.979
Fructosa	189047	-7702	0.983



## ANEXO 5. Curva Patrón de concentración de Amonio

La concentración de tartrato de amonio en los extractos de biotransformación con medio de cultivo A, se determinó por medio de la técnica de determinación de amonio. La curva patrón se elaboró a partir de una solución de nitrato de amonio en un rango de 0-500 mg/l (Figura A.4).

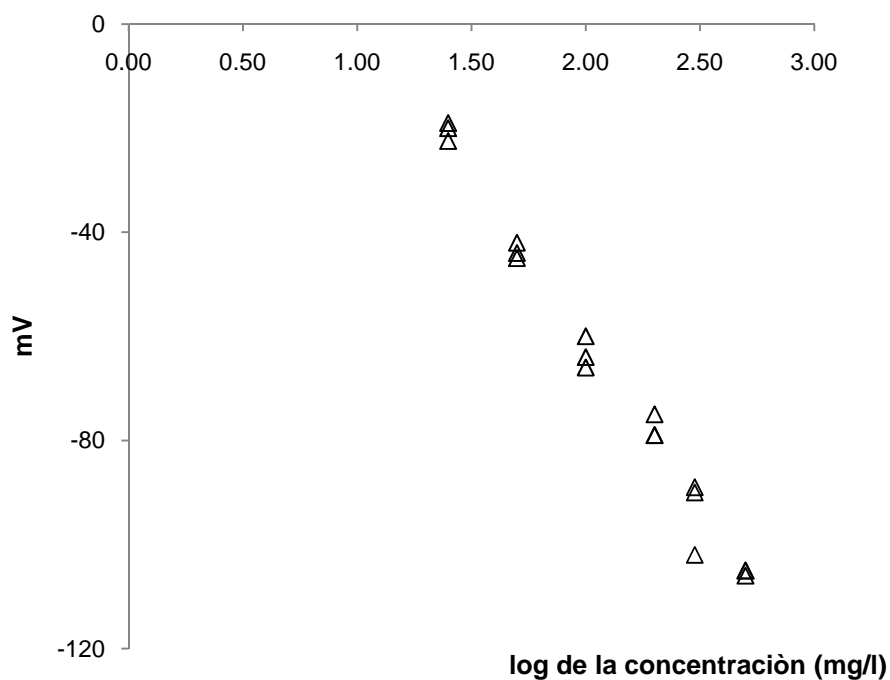


Figura A.5. Curva patrón de concentración de amonio.

A partir de la regresión lineal de la curva de concentración de amonio, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = -61.702x + 61.184 \quad R^2 = 0.993$$

Que fue usado para calcular las concentraciones de amonio en los extractos de los cultivos

## ANEXO 6. Preparación de Soluciones del Método de Lowry

### Reactivos

A  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (J.T. Baker) al 2% en NaOH (J.T. Baker) 0.1N

B  $\text{CuSO}_4$  (J.T. Baker) al 1% en  $\text{H}_2\text{O}$

C Tartrato de Na y K (J.T. Baker) al 2% en  $\text{H}_2\text{O}$

D Reactivo de Folin Ciocalteu (Sigma) 1:1 en agua

### Procedimiento

1. Se mezclaron 50 volúmenes de A + 1 volumen de B + 1 volumen de C, de esta solución se tomaron 5 ml y se les agregó 1 ml de muestra.
2. Después de dejar reposar 10 minutos, en la oscuridad, se agregaron 0.5 ml de reactivo D.
3. Finalmente se dejó reposar 30 minutos en la oscuridad y se leyó a  $\lambda_{590}$  nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160 A.

### ANEXO 6.1 Curva patrón de seroalbúmina para la determinación de proteína

Para determinar la concentración de proteína en el extracto enzimático de la cepa diploide DAR 2, se usó el método de Lowry y se elaboró la curva patrón de concentración de proteína con seroalbúmina como solución de referencia, la curva se construyó en un rango de concentración de 0-500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a partir de una solución de 1  $\text{mg}/\text{ml}$  (Figura A.6)

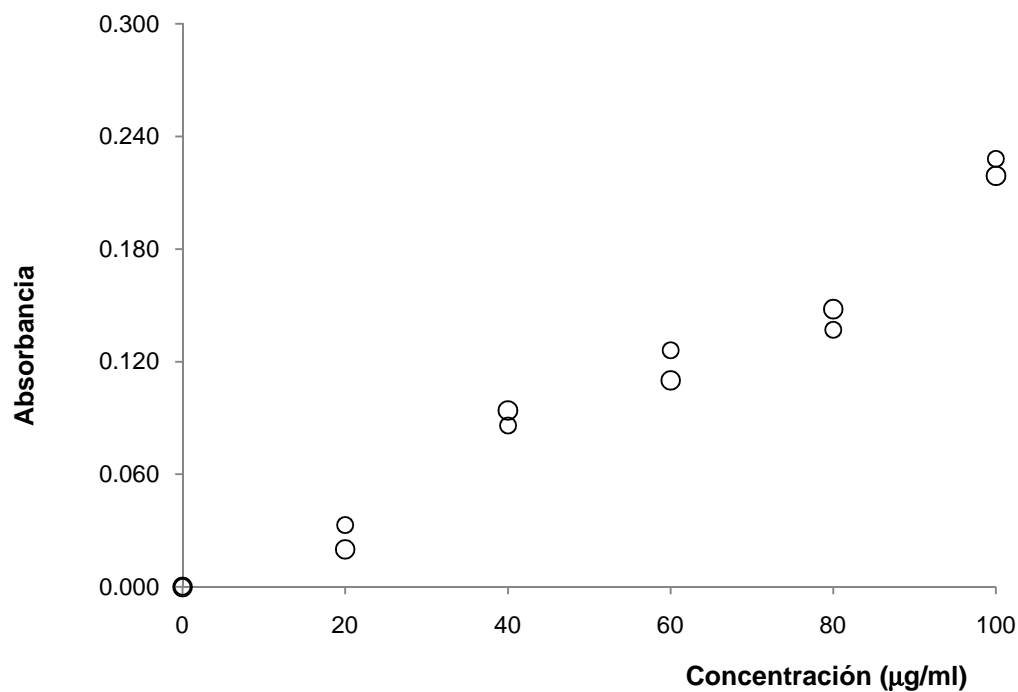


Figura A.6. curva patrón de concentración de seroalbúmina.

A partir de la regresión de la curva, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 0.0023x - 0.0054 \quad R^2 = 0.990.$$



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00073

Matrícula: 206180575

"BIOTRANSFORMACION DE ACIDOS  
HIDROXICINAMICOS POR HONGOS  
DEL GENERO *Aspergillus*"

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA

12 JUL 2010

COORDINACION DE SISTEMAS ESCOLARES

En México, D.F., se presentaron a las 11:00 horas del día 5 del mes de julio del año 2010 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL  
DR. EDUARDO GONZALEZ ZAMORA  
DRA. ISABELLE GAIME-PERRAUD  
DR. JOSE RAMON VERDE CALVO



*Itzamna Baqueiro Peña*  
ITZAMNA BAQUEIRO PEÑA  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA  
DE: ITZAMNA BAQUEIRO PEÑA

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

*Aprobar*

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

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

*Ruben Roman Ramos*  
DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTE

*Octavio Loera Corral*  
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

*Eduardo Gonzalez Zamora*  
DR. EDUARDO GONZALEZ ZAMORA

VOCAL

*Isabelle Gaime-Perraud*  
DRA. ISABELLE GAIME-PERRAUD

SECRETARIO

*Jose Ramon Verde Calvo*  
DR. JOSE RAMON VERDE CALVO