

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD



Casa abierta al tiempo

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

**“EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA
DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO DE LA PULPA DE CAFÉ”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

M.C. LUIS VÍCTOR RODRÍGUEZ DURÁN

DIRECTOR

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

ASESORES

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Universidad Autónoma de Coahuila

Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

México, D.F.

Marzo de 2016

**El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma
Metropolitana de la Unidad Iztapalapa está incluido en el Programa
Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del CONACyT con la
referencia 001466**

México D.F. 7 de Marzo de 2016

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

**EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y TRANSFORMACIÓN ENZIMÁTICA DEL
ÁCIDO CLOROGÉNICO DE LA PULPA DE CAFÉ**

que presentó

Luis Víctor Rodríguez Durán

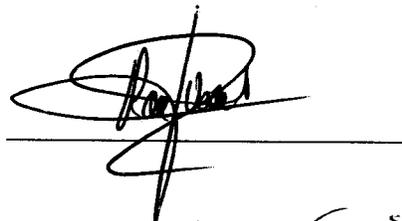
Director Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesores Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Universidad Autónoma de Coahuila

Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

JURADO

Presidente: José Ramón Verde Calvo
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Secretario: Ricardo Beristain Cardoso
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma

PA Ma del Cuytojardo

Vocal: Sergio Alatorre Santamaría
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Vocal: Cristóbal Noé Aguilar González
Universidad Autónoma de Coahuila



Agradecimientos

Al Dr. Gerardo Saucedo por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y dirigir mi tesis doctoral. Por todas sus enseñanzas en lo académico y en lo personal.

Al Dr. Cristóbal Aguilar, por aceptarme como su alumno desde desde que era un joven estudiante universitario. Por brindarme su apoyo y amistad.

Al Dr. Ernesto Favela, por su asesoría y consejos. Fue un placer discutir mis resultados con usted.

A la Dra. Ascención Ramírez. Su apoyo y asesoría fueron de gran importancia para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Aranda Delgado, por su ayuda para obtener el material vegetal utilizado en este trabajo.

A los Doctores Arely Prado, Sergio Huerta y Gustavo Viniegra por sus consejos y palabras de apoyo cuando más las necesitaba.

A los doctores Ramón Verde, Ricardo Beristain y Sergio Alatorre por aceptar formar parte del comité de evaluación, así como por sus valiosos comentarios.

A todos mis compañeros y excompañeros de la PP4: Francisco Martínez, Juan Buenrostro, Gregorio Juárez, Fernando Méndez, Javier Porcayo, Raziel Estrada, Cándida Martínez, Patricia Ruiz entre muchos más. Sus comentarios y críticas constructivas a mi trabajo fueron de gran ayuda.

A mis hermanas y mi madre que siempre estuvieron conmigo, aunque la distancia nos separara.

A Alejandra por comprenderme y apoyarme en los momentos más difíciles.

Resumen

La pulpa de café (PC) es el principal subproducto sólido derivado del beneficio húmedo del café y representa alrededor del 40% del peso fresco del fruto. Anualmente se producen más de 400 000 toneladas de PC en México y las aplicaciones tradicionales sólo aprovechan una fracción de este subproducto. Por ello, es necesario encontrar usos alternativos para la PC. Una de las aplicaciones más prometedoras para valorizar este subproducto consiste en la obtención de valiosos compuestos naturales con actividades biológicas. En el presente trabajo se desarrollaron metodologías para la extracción y purificación del ácido clorogénico (ACL) de la PC, el cual se utilizó para la síntesis enzimática de éster fenético del ácido cafeico (CAPE).

En la primera etapa experimental, se analizó el contenido de ácidos hidroxicinámicos (AHCs) solubles e insolubles de la PC obtenida de frutos de siete variedades en tres diferentes estados de madurez, así como muestras de PC provenientes de un beneficio comercial. Todos los frutos fueron cultivados en el Estado de Veracruz. Los AHCs se encontraron principalmente en la fracción soluble en metanol (68-97%) de la PC. El ACL fue el ácido fenólico más abundante en la fracción soluble (94-98%), mientras que el ácido cafeico (AC) fue el ácido fenólico más abundante en la fracción insoluble (72-88%).

El contenido total de AHCs de la PC se incrementó del estado inmaduro (2.0-10.7 mg/g PC) al estado semi-maduro (7.4-25.5 mg/g PC) pero disminuyó en el estado maduro (3.0-6.5 mg/g PC) para seis de las siete variedades analizadas. El mayor contenido de AHCs (25.2-25.5 mg/g PC) se encontró en la PC obtenida de los frutos semi-maduros de las variedades Garnica Rojo y Garnica Amarillo. Sin embargo, se seleccionó la PC obtenida del proceso comercial para la extracción preparativa de ACL debido a su mayor disponibilidad.

En una segunda etapa se desarrolló una metodología para la extracción y purificación rápida del ACL de la PC. El protocolo final consistió en una extracción asistida por microondas (EAM) seguida de una cromatografía en una columna empacada con amberlita XAD-16 y una cromatografía en HPLC semi-preparativo usando una columna C18. Con la EAM se recuperó el 71.6% del ACL total de la PC en un corto tiempo de extracción (4 min) mediante un proceso rápido, sencillo y reproducible. La metodología propuesta para la

purificación del ACL permitió la obtención un extracto con una pureza del 61.7% con un rendimiento del 43.4% en un proceso rápido.

Posteriormente se evaluaron 10 cepas fúngicas por su capacidad para crecer en placas de agar con ACL como única fuente de carbono, formar halos de hidrólisis de ACL y producir enzimas con actividad clorogenato hidrolasa en un sistema de fermentación en medio sólido (FMS). De las 10 cepas evaluadas, las del género *Aspergillus* produjeron halos de hidrólisis y actividad clorogenato hidrolasa.

Se encontraron diferencias entre los perfiles de producción de actividad clorogenato hidrolasa, actividad máxima y productividad obtenidas con diferentes microorganismos. Sin embargo estas diferencias no fueron determinantes para seleccionar una cepa para la producción de actividad clorogenato hidrolasa. Por ello, los extractos producidos por las nueve cepas del género *Aspergillus* se probaron como catalizadores para la síntesis enzimática de CAPE a partir de AC, ACL y extractos ricos en ACL obtenidos de la PC.

En la última etapa se estudió la síntesis enzimática de CAPE catalizada por enzimas comerciales y extractos enzimáticos producidos por FMS. La lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada (Novozym® 435) es capaz de catalizar la síntesis de CAPE por esterificación entre AC y alcohol fenético (2-FE), pero no por transesterificación entre ACL y 2-FE (rendimiento < 1%) usando isooctano como medio de reacción. El uso de disolventes y cosolventes más polares mejoró la solubilidad del AC, pero no incrementó el rendimiento de la reacción.

Las reacciones de esterificación entre AC y 2-FE y de transesterificación entre ACL y 2-FE en microemulsiones (agua-AOT-isooctano) catalizadas por la hemicelulasa NS22002 fueron mucho más rápidas que las mismas reacciones catalizadas por una lipasa B de *C. antarctica* (CALB) (constante cinética, k , 8 y 990 veces mayor, para las reacciones de esterificación y transesterificación, respectivamente).

La síntesis enzimática de CAPE catalizada por NS22002 y por extractos enzimáticos producidos en FMS fue posible usando ACL grado analítico, así como extractos ricos en ACL obtenidos de la PC. Los rendimientos obtenidos usando un extracto enzimático concentrado de *A japonicus* AN5 (34.48-37.10%) fueron menores a los obtenidos con la

enzima comercial NS22002 (47.31-53.57%), pero mayores a los reportados en la bibliografía para una clorogenato hidrolasa de *A. ochraceus* (9.4%).

Durante la síntesis enzimática de CAPE a partir de ACL en microemulsiones se observó la formación de AC por hidrólisis del ACL. En el sistema catalizado por la hemicelulasa NS22002, la acumulación de AC y CAPE ocurrió de manera simultánea (reacciones en paralelo). Mientras que en el sistema catalizado por los extractos enzimáticos de *Aspergillus* spp., la acumulación de AC y CAPE se dio de manera secuencial (reacciones en serie). La concentración de ACL, AC y CAPE en ambos sistemas fue modelada satisfactoriamente con un modelo cinético de pseudo primer orden.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que es posible extraer, purificar y transformar el ACL de la PC para obtener compuestos valiosos como el CAPE. La metodología desarrollada puede utilizarse para dar un valor agregado a un subproducto agroindustrial actualmente subutilizado en nuestro país. Sin embargo, se requiere de mayor investigación para optimizar estos procesos y hacerlos económicamente más atractivos.

Abstract

Coffee pulp (CP) is the main solid by-product obtained from wet processing of coffee cherries and it represents about 40% of fresh weight of coffee fruits. Annual production of CP in Mexico is over 400 000 tonnes, and traditional applications only use a fraction of this by-product. Thus, it is necessary to find alternative uses for CP. One of the most promising applications for valorization of CP consists of obtaining valuable natural compounds with biological activities. In the present study, we developed methodologies for the extraction and purification of chlorogenic acid (CGA) from CP. The CGA obtained was used as substrate for the enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester (CAPE).

As a first step, we analyzed the content of soluble and insoluble hydroxycinnamic acids (HCAs) in CP obtained from fruits of seven cultivars at three ripening stages, as well as CP from a commercial process. HCAs were mainly in the soluble fraction (68-97%) of CP. CGA was the most abundant phenolic acid in this fraction (94-98%). While caffeic acid (CA) was the most abundant phenolic acid in the insoluble fraction (72-88%).

Total HCAs content in CP increased from unripe stage (2.0-10.7 mg/g CP) to the semi-ripe stage (7.4-25.5 mg/g CP), but decreased at the ripe stage (3.0-6.5 mg/g CP) for six of the seven analyzed cultivars. The highest content of total HCAs (25.2-25.5 mg/g CP) was found in CP obtained from semi-ripe fruits from Yellow and Red Garnica cultivars. However, CP from a commercial was selected for preparative extraction of CGA because of their greater availability.

In a second stage, a new methodology for the rapid extraction and purification of CGA from CP was developed. Final procedure consisted of microwave assisted extraction (MAE) followed by column chromatography on Amberlite XAD-16 and semi-preparative HPLC using a C18 column. It was possible to extract 71.6% of total CGA from CP by MAE in a short extraction time (4 min). The proposed MAE is a simple and reproducible process, not requiring the use of toxic solvents. The methodology used for the purification led to obtaining a CGA rich extract with a purity of 61.7% and a yield of 43.4% in a quick and simple process.

Later, ten fungal strains were evaluated for their ability to grow on agar plates with CGA as sole carbon source, to form hydrolysis halos and to produce chlorogenate hydrolase activity in a solid state fermentation (SSF) system. All tested strains were able to grow in this medium, but only strains from the genus *Aspergillus* produced halos of hydrolysis and chlorogenate hydrolase activity.

Differences between chlorogenate hydrolase activity production profiles, maximum activity and productivity were found. However, these differences were not decisive for selecting a microorganism to produce chlorogenate hydrolase activity. Therefore, the enzymatic extracts produced by nine *Aspergillus* strains were tested as catalysts for enzymatic synthesis of CAPE from CA, CGA and CGA-rich extracts obtained from CP was studied.

In the last stage, enzymatic synthesis of CAPE catalyzed by commercial enzymes and crude extracts produced by fungi in SSF was studied. Immobilized lipase B from *C. antarctica* (Novozyme® 435) catalyzed the synthesis of CAPE by esterification between CA and 2-phenylethanol (2-PE), but not by transesterification between CGA and 2-PE (yield < 1%).

The esterification between CA and 2-PE and the transesterification between CGA and 2-PE in water-AOT-isooctane microemulsions was catalyzed by NS22002 hemicellulase at a much higher rate than the same reactions catalyzed by a *C. antarctica* lipase B CALB (kinetic constant k 8 and 990 times higher for esterification and transesterification reactions, respectively).

Enzymatic synthesis of CAPE catalyzed by NS22002 lipase and enzymatic extracts produced in SSF is possible using analytical grade CGA as well as CGA-rich extracts obtained from CP. The yields obtained using a concentrated enzymatic extract from *A. japonicus* AN5 (34.48-37.10%) were lower than those obtained with NS22002 (47.31-53.57%), but higher than those reported for a chlorogenate hydrolase from *A. ochraceus* (9.4%).

During enzymatic synthesis of CAPE from CGA in microemulsions, GCA hydrolysis and CA formation was observed. In the system catalyzed by NS22002 hemicellulase,

accumulation of CA and CAPE occurred simultaneously (parallel reactions). Whereas in the system catalyzed by enzymatic extracts from *Aspergillus* spp., accumulation of CA and CAPE occurred sequentially (consecutive reactions). A pseudo first order kinetic model successfully modeled CGA, CA and CAPE concentrations in both systems.

The results obtained in this study show that it is possible to extract, purify and transform CGA from CP to obtain valuable compounds as CAPE. The proposed methodology can be used to give added value to an agro-industrial by-product currently underutilized in our country. However, it requires further research to optimize these processes and make them economically more attractive.

Índice de contenido

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica	4
2.1 Pulpa de café (PC)	4
2.1.1 Usos de la PC.....	4
2.1.2 Composición de la PC	7
2.1.3 Compuestos fenólicos en la PC	8
2.2 Aprovechamiento de los AHCs de la PC	13
2.2.1 Extracción.....	13
2.2.2 Aislamiento y purificación	14
2.2.3 Transformación enzimática de AHCs.....	15
2.3 Síntesis de CAPE.....	17
2.3.1 Síntesis química.....	19
2.3.2 Síntesis enzimática	20
2.4 Enzimas utilizadas para la transformación de AHCs	22
2.4.1. Lipasas	22
2.4.2. Feruloil esterasas	24
2.4.3. Clorogenato hidrolasas	26
2.5 Comentarios finales	28
3. Justificación	29
4. Hipótesis	30
5. Objetivos.....	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos específicos	31
6. Caracterización y selección del material vegetal.....	32

6.1 Resumen	32
6.2 Introducción.....	32
6.3 Materiales y métodos.....	33
6.3.1 Material vegetal	33
6.3.2 Caracterización física de los frutos de café	34
6.3.3 Extracción de los AHCs solubles e insolubles	35
6.3.4 Análisis por HPLC	35
6.3.5 Análisis estadístico	36
6.4 Resultados y discusión	37
6.4.1 Caracterización física de los frutos de café	37
6.4.2 Extracción de AHCs solubles e insolubles	40
6.4.3 Contenido de AHCs de la PC de diferentes variedades.....	42
6.5 Conclusiones.....	49
7. Extracción y purificación del ACL de la PC	50
7.1 Resumen	50
7.2 Introducción.....	51
7.3 Materiales y métodos.....	52
7.3.1 Materiales	52
7.3.2 Extracción enzimática de los AHCs de la PC	52
7.3.3 Extracción asistida por microondas de ACL de la PC.....	53
7.3.4 Purificación del ACL de la PC	53
7.3.5 Métodos analíticos.....	55
7.3.6 Análisis estadístico	55
7.4 Resultados y discusión	55
7.4.1 Extracción enzimática de los AHCs de la PC	55

7.4.2 Extracción asistida por microondas de ACL de la PC.....	58
7.4.3 Purificación del ACL de la PC	61
7.5 Conclusiones.....	64
8. Producción de extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa.....	66
8.1 Resumen	66
8.2 Introducción.....	67
8.3 Materiales y métodos.....	67
8.3.1 Búsqueda de microorganismos productores de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa	67
8.3.2 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en viales	69
8.3.3 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en columnas	70
8.3.5 Métodos analíticos.....	70
8.3.6 Estimación de parámetros cinéticos	72
8.4 Resultados y discusión	74
8.4.1 Selección de microorganismos productores de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa	74
8.4.2 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en viales	76
8.4.3 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en columnas	79
8.5 Conclusiones.....	88
9. Síntesis enzimática de CAPE	90
9.1 Resumen	90
9.2 Introducción.....	91
9.3 Materiales y métodos.....	92
9.3.1 Materiales	92

9.3.2 Estrategia experimental	93
9.3.3 Selección de enzimas comerciales para la síntesis de CAPE	94
9.3.4 Síntesis enzimática de CAPE en disolventes orgánicos	95
9.3.5 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones	95
9.3.6 Análisis de los sustratos y productos.....	97
9.3.7 Expresión de resultados.....	97
9.4 Elementos teóricos del modelamiento de la síntesis de CAPE	97
9.4.1 Formación de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE	99
9.4.2 Formación de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE	101
9.5 Resultados y discusión	104
9.5.1 Actividad clorogenato hidrolasa de enzimas comerciales.....	104
9.5.2 Síntesis enzimática de CAPE en disolventes orgánicos	106
9.5.3 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones	112
9.5.4 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos producidos en FMS.....	121
9.6 Conclusiones.....	125
10. Conclusiones generales.....	127
11. Referencias	129
12. Anexos	142
Anexo 1. Modelos usados para la estimación de parámetros cinéticos de la FMS	142
Anexo 2. Material suplementario del capítulo 8.....	143
Anexo 3. Parámetros estimados para la simulación de las reacciones enzimáticas	147
Anexo 4. Simulación de las reacciones enzimáticas estudiadas.....	151
Anexo 5. Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de AHCs	157
Anexo 6. Publicaciones y presentaciones en congresos.....	159

Índice de figuras

2.1 Estructura genérica de las principales subclases de flavonoides	10
2.2 Estructura de los principales ácidos fenólicos	11
2.3 Isómeros del ácido clorogénico	12
2.4 Estructura del ester fenetílico del ácido cafeico	17
6.1 Cromatogramas representativos de una mezcla de estándares, un extracto metanólico y un hidrolizado alcalino	36
6.2 Frutos de café de siete variedades en tres estados de madurez	37
6.3 Peso y volumen unitario de los frutos de café analizados	38
6.4 Extracción de ACL de la PC por extracciones sucesivas con metanol acidificado y de AC de la PC por hidrólisis alcalina con diferentes concentraciones de NaOH	41
6.5 Contenido de AHCs totales en la PC de frutos de siete variedades en tres estados de madurez	44
7.1 Extracción de AHCs por hidrólisis	56
7.2 Extracción de AHCs por hidrólisis con enzimas comerciales independientes	57
7.3 Efecto del solvente y de la concentración del solvente sobre la extracción de ACL de la PC por EAM	59
7.4 Efecto de la temperatura y el tiempo de extracción sobre la recuperación de ACL de la PC por EAM	60
7.5 Cromatogramas semi-preparativos del extracto libre de azúcares usando un método isocrático y de gradientes	63
7.6 Cromatogramas analíticos del extracto libre de azúcares y el extracto parcialmente purificado por HPLC semi-preparativo	64
8.1 Técnica de crecimiento radial y halos de hidrólisis	69
8.2 Crecimiento radial de 10 cepas fúngicas en medio agar Asther modificado, con ACL como única fuente de carbono	74
8.3 Consumo de ACL durante la FMS en viales	77
8.4 Acumulación de AC por durante la FMS en viales	78

8.5 Actividad clorogenato hidrolasa durante la FMS en viales	79
8.6 Tasa de producción de CO ₂ de las 9 cepas del género <i>Aspergillus</i> durante la FMS en columnas	80
8.7 Producción de CO ₂ durante la FMS en columnas	81
8.8 Tasa de consumo de O ₂ de las 9 cepas del género <i>Aspergillus</i> durante la FMS en columnas	82
8.9 Consumo acumulado de O ₂ durante la FMS en columnas	83
8.10 Evolución del coeficiente respiratorio durante la FMS en columnas	86
8.11 Producción de actividad clorogenato hidrolasa durante la FMS en columnas	86
9.1 Estrategia experimental utilizada para la síntesis enzimática de CAPE	94
9.2 Reacciones estudiadas para la síntesis enzimática de CAPE	96
9.3 Modelamiento de la esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 en isooctano por dos métodos	107
9.4 Consumo de sustrato y producción de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por Novozym® 435 en isooctano	109
9.5 Síntesis enzimática de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 usando diferentes sistemas de solventes	111
9.6 Curvas de progreso de la síntesis de CAPE por esterificación y transesterificación en microemulsiones usando una lipasa y una hemicelulasa como catalizadores	112
9.7 Efecto de la temperatura y del pH sobre la constante cinética de producción de CAPE en microemulsiones	115
9.8 Efecto del grado de hidratación del surfactante y de la concentración del surfactante sobre la síntesis enzimática de CAPE	117
9.9 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por Novozymes NS22002 en microemulsiones usando ACL y un extracto de PC como sustrato	120
9.10 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos de <i>Aspergillus</i> spp producidos en FMS	121

9.11 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones catalizada por un extracto enzimático concentrado de *A. japonicus* usando ACL y extracto de PC como sustrato.

124

Índice de tablas

2.1 Aplicaciones y usos potenciales de la PC	5
2.2 Composición química de la PC	7
2.3 Concentración de los compuestos fenólicos presentes en la PC	9
2.4 Patentes seleccionadas sobre los usos del CAPE	18
6.1 Cromaticidad de la superficie de los frutos de siete variedades en tres estados de madurez	39
6.2 Contenido de AHCs solubles en la PC de procedente de siete variedades de <i>C. arabica</i> en tres estados de madurez del estado de Veracruz.	46
6.3 Contenido de AHCs insolubles en la PC de siete variedades de <i>C. arabica</i> en tres estados de madurez	47
6.4 Contenido de AHCs solubles e insolubles en la PC obtenida de un proceso comercial	48
7.1 Purificación de ACL a partir de un extracto etanólico de PC obtenido por EAM	61
8.1 Microorganismos utilizados para la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa	68
8.2 Crecimiento radial e índice de potencia de 10 cepas fúngicas en agar con ACL como única fuente de carbono	75
8.3 Hidrólisis del ACL durante la FMS en viales	78
8.4 Parámetros cinéticos calculados con el modelo logístico	81
8.5 Parámetros de consumo de O ₂ estimados por el modelo de Pirt	83
8.6 Parámetros calculados para el modelo de Luedeking-Piret	87
9.1 Actividad clorogenato hidrolasa de preparaciones enzimáticas comerciales	105
9.2 Suma de errores al cuadrado y coeficiente de determinación entre los datos experimentales y los datos calculados por dos métodos	107
9.3 Síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por Novozym® 435 en isooctano	109
9.4 Caracterización de síntesis de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 en diferentes sistemas de solventes	111

9.5 Síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por enzimas comerciales en microemulsiones	113
9.6 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la temperatura	115
9.7 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto del pH	116
9.8 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la w_0	118
9.9 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la concentración de AOT	118
9.10 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por una preparación enzimática comercial (NS22002) usando ACL y extracto de PC como sustrato	120
9.11 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos de <i>Aspergillus</i> spp producidos en FMS	122
9.12 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por un extracto enzimático concentrado de <i>A. japonicus</i> usando ACL y extracto de PC como sustrato	123

Glosario de abreviaturas

2-FE	2-Fenil etanol	FAE	Feruloil esterasa
2-PE	2-Phenylethanol	FAPE	Ester feniletílico del ácido ferúlico
AC	Ácido cafeico	FMS	Fermentación en medio sólido
ACL	Ácido clorogénico	FQ	Feruloil quínico
AF	Ácido ferúlico	HCA	Hydroxycinnamic acids
AHBs	Ácidos hidroxibenzoicos	HMPA	Hexametilfosforamida
AHCs	Ácidos hidroxicinámicos	HPLC	Cromatografía líquida de alto desempeño
AoC	Ácido <i>orto</i> -cumárico	HSCCC	Cromatografía contracorriente de alta velocidad
AOT	Diocetil-sulfosuccinato de sodio (Aerosol® OT)	JP	Japón
ApC	Ácido <i>para</i> -cumárico	KR	Corea del Sur
AQ	Ácido quínico	LV	Letonia
bs	Base seca	MAE	Microwave assisted extraction
CA	Caffeic acid	MC	Cafeato de metilo
CALB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>	MF	Ferulato de metilo
CAPE	Ester fenético del ácido cafeico	MpC	<i>p</i> -Cumarato de metilo
CGA	Chlorogenic acid	MS	Sinapato de metilo
CQ	Cafeoil quínico	ms	Materia seca
CR	Coeficiente respiratorio	msi	Materia seca inicial
CP	Coffee pulp	PC	Pulpa de café
CY	Chipre	PCH	Punto crítico de humedad
DCC	<i>N,N'</i> -diclohexilcarbodiimida	pCQ	<i>para</i> -cumaroil quínico
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida	PLU	Unidades propil-laurato
DMSO	Dimetilsulfóxido	SSF	Solid state fermentation
EAM	Extracción asistida por microondas	THF	Tetrahidrofurano
EAU	Extracción asistida por ultrasonido	TW	Taiwan
EFSC	Extracción con fluidos supercríticos	USA	Estados Unidos de América

1. Introducción

La pulpa de café (PC) es el principal subproducto sólido derivado del beneficio húmedo del café y representa alrededor del 40% del peso fresco del fruto del café (Aranda *et al.*, 2004). Las aplicaciones tradicionales de la PC incluyen su uso como fertilizante, alimento animal o composta. Mediante estas aplicaciones se aprovecha sólo una fracción de la PC disponible. Por ello, es necesario encontrar usos alternativos para este subproducto (Murthy y Naidu, 2012).

Una de las aplicaciones potenciales más prometedoras de la PC consiste en la extracción de compuestos fenólicos presentes en este subproducto. Mediante este procedimiento se pueden obtener compuestos con importantes actividades biológicas y diversas aplicaciones industriales. Además, la PC libre de compuestos fenólicos puede ser utilizada para alguna de las aplicaciones tradicionales antes mencionadas.

El ácido clorogénico (ACL) es el ácido fenólico más abundante en la PC, se encuentra en concentraciones de 2 a 12 g/kg de PC (bs) y representa del 51 al 81% de los ácidos hidroxicinámicos (AHCs) y derivados presentes en la PC (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004). El ACL puede ser hidrolizado química o enzimáticamente para obtener cantidades equimolares de ácido cafeico (AC) y ácido quínico (AQ). Estos compuestos tienen propiedades biológicas interesantes que pueden dar lugar a aplicaciones industriales. El AQ es utilizado como materia prima para la síntesis asimétrica de compuestos naturales y derivados, como el ácido shikímico (Barco *et al.*, 1997). El ácido shikímico se usa como sustrato para la síntesis comercial del oseltamivir, el compuesto activo en algunos antivirales como el Tamiflu® (Jiang y Singh, 1998). El ACL y el AC tienen propiedades antioxidantes, antivirales, anticancerígenas y antiinflamatorias (Lin y Yan, 2012). Además, pueden ser utilizados para la síntesis de compuestos bioactivos como el éster fenético del ácido cafeico (CAPE) (LeBlanc *et al.*, 2012).

El CAPE es uno de los principales compuestos activos del propóleo (un producto de las abejas). El CAPE presenta actividad biológicas importantes como: antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, inmunomoduladora, anti-invasiva, carcinostática, entre otras (Watanabe *et al.*, 2011 y las referencias citadas).

Actualmente, el CAPE se extrae de fuentes naturales. El proceso es sencillo, pero lento. Además, la purificación del CAPE obtenido de fuentes naturales es complicada. Por ello, se han buscado métodos para la síntesis de CAPE (Ye *et al.*, 2012).

Los métodos químicos utilizados involucran tiempos de preparación de hasta 96 h con rendimientos variables del 30 al 86% (Zhang *et al.*, 2014 y las referencias citadas). Los métodos enzimáticos publicados consisten, en su mayoría en la esterificación de AC y alcohol fenético (2-FE) catalizada por preparaciones comerciales de lipasas inmovilizadas. En estas reacciones se alcanzan altos rendimientos (90-100%) con tiempos de reacción prolongados (48-60 h) y requieren grandes cantidades de biocatalizador (hasta 15 mg de biocatalizador/mg de AC) debido a las bajas tasas de reacción (Widjaja *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010). Estas bajas tasas de reacción pueden estar asociadas con la baja afinidad por los sustratos utilizados, así como a la baja solubilidad de los mismos.

Una alternativa para incrementar las tasas de reacción y reducir el tiempo necesario para la síntesis enzimática de CAPE consiste en utilizar una enzima con mayor afinidad a los sustratos, como la clorogenato hidrolasa. Sin embargo, actualmente no existen fuentes comerciales de esta enzima.

En el presente trabajo se estudió la síntesis enzimática de CAPE a partir de ACL obtenido de la PC. Se caracterizó la composición de diferentes variedades de café en tres estados de madurez en función de su contenido de AHCs. Se extrajo y se purificó el ACL de la PC, el cual se transformó enzimáticamente. Las reacciones de síntesis de CAPE fueron modeladas matemáticamente, lo cual permitió comparar cuantitativamente las diferentes reacciones estudiadas. La transesterificación de ACL a CAPE se llevó a cabo utilizando enzimas comerciales con actividad clorogenato hidrolasa así como extractos enzimáticos producidos por hongos filamentosos en un sistema de fermentación en medio sólido (FMS).

En el capítulo 6 se presenta la caracterización del material vegetal (PC). Se analizó el contenido de AHCs libres y esterificados de la PC obtenida de frutos de siete variedades en tres diferentes estados de madurez, así como una muestra de PC obtenida de un proceso comercial. En el capítulo 7 se desarrollaron metodologías para la extracción rápida de AHCs de la PC. Posteriormente se utilizaron cromatografías en columna para obtener un extracto rico en ACL a partir de un extracto etanólico de PC.

En el capítulo 8 se describe la producción de extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa. Se evaluaron 10 cepas fúngicas por su capacidad para crecer en placas de agar con ACL como única fuente de carbono y formar halos de hidrólisis. Las cepas capaces de crecer en este medio se utilizaron para la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa en fermentación en medio sólido (FMS). Finalmente, en el capítulo 9 se estudió la síntesis enzimática de CAPE a partir de AC, ACL y extractos ricos en ACL obtenidos de la PC. Estas reacciones fueron catalizadas por enzimas comerciales y extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa producidas por FMS.

2. Revisión bibliográfica

En México, la producción de café ocupa una superficie de cultivo de 791,916 Ha y es la principal actividad económica de más de 4,500 comunidades en doce Estados de la República, de las cuales el 60% son de población indígena. La agroindustria del café mexicano genera anualmente más de 700 mil empleos directos e indirectos, de los que dependen más de 3 millones de personas. Por ello, la cafeticultura tiene una gran importancia económica y social para nuestro país (Gómez-Crespo, 2001; SIAP, 2015). Por otra parte, la agroindustria cafetalera también es una fuente importante de residuos y contaminación. Se estima que esta industria genera en México más de medio millón de toneladas de subproductos sólidos al año (Valdez-Vazquez *et al.*, 2010).

2.1 Pulpa de café (PC)

La PC es el principal subproducto sólido derivado del beneficio húmedo del café. La PC consiste en la piel exterior o pericarpio del fruto, y la mayor parte del mesocarpio (Esquivel y Jiménez, 2012). La presencia de compuestos tóxicos y anti-nutricionales limita su uso en diversas aplicaciones, como en la alimentación animal (Ulloa *et al.*, 2004). Además, la PC fresca tiene un alto contenido de humedad (alrededor del 77%), lo cual dificulta su manejo y transporte (Bressani, 1979a).

En el año 2014 se produjeron 1166 millones de toneladas de café cereza (SIAP, 2015), de los cuales el 86% se procesaron mediante el beneficio húmedo (SIAP, 2005), generando más de 400 mil toneladas de PC fresca. Esto es más de 100 mil toneladas en base seca (Bressani, 1979a). Por ello, diversos investigadores han desarrollado procesos para el aprovechamiento de la PC (Tabla 2.1). Sin embargo, pocas de estas técnicas se aplican realmente en nuestro país, por lo que gran parte de la PC generada en México es almacenada cerca de los beneficios, produciendo malos olores, problemas de contaminación al manto freático y la eutrofización de ríos y lagunas donde es vertida (Houbron *et al.*, 2007).

2.1.1 Usos de la PC

La PC contiene una gran cantidad de nutrientes que podrían ser utilizados en la alimentación animal. Sin embargo, su alto contenido de compuestos tóxicos y anti-nutricionales limita su uso para este fin. Se ha encontrado que para ciertos animales, como

las vacas lecheras, se puede utilizar hasta un 20% de PC en su alimentación sin un efecto negativo en su crecimiento. Sin embargo, para otros animales, como los gallos, el límite es tan bajo como el 5% en peso (Noriega-Salazar *et al.*, 2008). Una alternativa para el aprovechamiento de la PC consiste en la detoxificación del residuo previo a su uso como alimento animal. La detoxificación de la PC se ha llevado a cabo mediante ensilaje y/o FMS con hongos filamentosos (Perraud-Gaime y Roussos, 1997; Ramírez-Martínez, 1999).

Tabla 2.1 Aplicaciones y usos potenciales de la PC

Producto	Referencia (s)
Alimento animal	(Ramírez-Martínez, 1999)
Fertilizante orgánico	(Aranda <i>et al.</i> , 2004)
Combustible sólido	(Musisi, 2009)
Bioetanol	(Shenoy <i>et al.</i> , 2011)
Biogas	(Calzada <i>et al.</i> , 1981)
Hongos comestibles	(Martínez-Carrera <i>et al.</i> , 2000)
Aromas	(Medeiros <i>et al.</i> , 2003)
Compuestos fenólicos	(Torres-Mancera <i>et al.</i> , 2011)
Enzimas (α -amilasa, xilanasa, pectinasa, lacasa, tanasa, FAE, clorogenato hidrolasa, etc.)	(Boccas <i>et al.</i> , 1994; Sobal <i>et al.</i> , 2003; Mata <i>et al.</i> , 2005; Adachi <i>et al.</i> , 2008; Murthy <i>et al.</i> , 2009; Murthy y Naidu, 2011; Pérez-Morales <i>et al.</i> , 2011)

La PC también puede usarse como fertilizante orgánico, principalmente para fertilizar los árboles de café. Sin embargo, el uso de la PC fresca como fertilizante tiene un inconveniente: su manejo es complicado debido a la alta humedad. Por ello, se ha propuesto el secado de la pulpa para su uso como fertilizante. Sin embargo, para igualar la composición química de 1 kg de fertilizante orgánico se requieren de 5 a 10 kg de PC seca (Bressani, 1979b). Una alternativa para mejorar las propiedades como bio-fertilizante de la PC es el compostaje y el vermicompostaje (Aranda *et al.*, 2004; Pierre *et al.*, 2009).

Otra de las aplicaciones tradicionales para la PC, es su uso como combustible. Tradicionalmente se ha usado la PC para la quema directa en los hornos utilizados en el secado del grano de café (Houbron *et al.*, 2007). Esto permite ahorrar energía en el beneficio

cuando se utiliza el secado mecánico. Sin embargo, no en todos los beneficios se usa este proceso. La aplicación de la PC como combustible; es muy limitada, debido a su baja densidad energética. Una alternativa para el aprovechamiento de la PC es la producción de combustibles sólidos comprimidos, como los pellets y las briquetas (Musisi, 2009).

La PC también ha sido empleada para la producción de combustibles gaseosos. Se ha reportado que se pueden producir 133 m³ de biogás a partir de la digestión anaerobia de una tonelada de PC. Esto equivale al contenido energético de 100 L de petróleo (Pandey *et al.*, 2000). El principal inconveniente de este proceso es el bajo valor económico del biogás, alrededor de 0.4 USD por m³ así como el costo del transporte de las materias primas y del gas producido (Birath, 2007). Recientemente se ha investigado el uso de la PC en la producción de bioetanol a partir de PC fresca y seca (Shenoy *et al.*, 2011).

La PC es un buen sustrato para la producción de hongos comestibles como *Pleurotus*, *Lentinula* y *Auricularia* (Martínez-Carrera *et al.*, 2000). En México, el cultivo rural de setas usando PC como sustrato comenzó en 1989 en una comunidad indígena de Puebla, y se ha extendido a otras regiones del país debido a las ventajas sociales, económicas y ecológicas para el desarrollo rural (Martínez-Carrera *et al.*, 1998). El cultivo de setas a nivel rural ha sido exitoso y sustentable. Sin embargo, una serie de inconvenientes técnicos y económicos han impedido llevar este proceso a nivel industrial (Martínez-Carrera *et al.*, 2000).

Se ha estudiado la producción de aromas usando PC como sustrato. Medeiros *et al.* (2003) estudiaron la capacidad de dos cepas de *Ceratocytis fimbriata* para producir aromas frutales mediante FMS usando PC como soporte y sustrato. Se detectaron 11 compuestos volátiles durante el cultivo, de los cuales el acetato de etilo y el etanol fueron los más abundantes.

La PC se ha utilizado como sustrato para la producción de diferentes enzimas por FMS. Se ha aprovechado la composición de la PC para la producción de enzimas que actúan sobre compuestos fenólicos, tales como la tanasa (Sobal *et al.*, 2003), lacasa (Mata *et al.*, 2005; Niladevi *et al.*, 2007), feruloil esterasa (Pérez-Morales *et al.*, 2011) y clorogenato hidrolasa (Adachi *et al.*, 2008). También se ha usado la PC para la producción de enzimas degradadoras de carbohidratos, como pectinasas (Boccas *et al.*, 1994; Nava *et al.*, 2011), xilanasa (Murthy y Naidu, 2011) y α -amilasa (Murthy *et al.*, 2009).

Una aplicación que ha llamado la atención recientemente es la extracción de compuestos fenólicos presentes en la PC. Esto se puede llevar a cabo mediante procesos químicos o biológicos, como la aplicación de enzimas o por la biotransformación por microorganismos mediante FMS (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Arellano-González *et al.*, 2011; Torres-Mancera, 2013).

2.1.2 Composición de la PC

La PC fresca tiene un alto contenido de humedad (mayor al 70%), lo cual dificulta su manejo. Para la mayoría de las aplicaciones, la PC debe secarse para evitar el crecimiento microbiano durante el almacenamiento. En la Tabla 2.2 se muestra la composición química de la PC seca.

Tabla 2.2 Composición química de la PC

Componente	Contenido (% p/p bs)**
Análisis proximal	
Grasa cruda	1.3 - 3.8
Fibra cruda	16.2 - 35.2
Proteína	8.0 - 15.0
Cenizas	5.0 - 9.5
Extracto libre de N	42.7 - 63.5
Carbohidratos*	66.5 - 84.4
Componentes de la pared celular	
Celulosa	10.5 - 28.6
Hemicelulosa	1.0 - 15.5
Lignina	12.2 - 22.8
Otros componentes orgánicos	
Taninos	0.7 - 4.6
Cafeína	0.7 - 1.8

*Carbohidratos = Fibra cruda + extracto libre de N

**Datos obtenidos de: (Elias, 1979; Awolumate, 1983; Peñaloza *et al.*, 1985; Donkoh *et al.*, 1988; Zuluaga-Vasco, 1989; Ulloa Rojas *et al.*, 2002).

La PC es especialmente rica en carbohidratos (66.5-84.4%) y tiene un contenido relativamente alto de proteína (8-15%) por lo que podría tener un alto valor nutricional. Pero también tiene cantidades significativas de compuestos antinutricionales, como taninos (0.7-

4.6 %) y cafeína (0.7-1.8%) (Elias, 1979; Awolunate, 1983; Peñaloza *et al.*, 1985; Donkoh *et al.*, 1988; Zuluaga-Vasco, 1989; Ulloa Rojas *et al.*, 2002).

La fracción de carbohidratos de la PC contiene, además de los componentes de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y lignina): azúcares reductores (12.40%), azúcares no reductores (2.02%) y sustancias pécticas (6.52%) (Wilboux, 1956; Elias, 1979).

2.1.3 Compuestos fenólicos en la PC

Una de las aplicaciones más atractivas para el aprovechamiento de la PC consiste en la extracción de compuestos fenólicos, debido a su alto valor comercial. Por ello, los compuestos fenólicos de la PC se han estudiado exhaustivamente desde hace más de 20 años. Se han identificado y cuantificado diferentes compuestos fenólicos en la PC, tales como flavanoles, flavonoles, antocianidinas, proantocianidinas, ácidos hidroxibenzóicos (AHBs), ácidos hidroxicinámicos (AHCs) y sus derivados (Tabla 2.3).

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos de 15 átomos de carbono formados por dos anillos aromáticos conectados por anillo heterocíclico de pirano (Kumar y Pandey, 2013). Estos compuestos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y en la piel de las frutas (Crozier *et al.*, 2006). Las principales subclases de flavonoides son las flavonas, flavonoles, flavan-3-oles, isoflavonas, flavanonas y antocianidinas. En la Figura 2.1 se muestran las estructuras genéricas de las principales subclases de flavonoides. Estas estructuras genéricas pueden tener numerosas sustituciones. Las más comunes son grupos hidroxilos, metilos y glucósidos. Estas moléculas pueden unirse para dar proantocianidinas oligoméricas o poliméricas, también conocidas como taninos condensados (Crozier *et al.*, 2006).

Tabla 2.3 Concentración de los compuestos fenólicos presentes en la PC

Compuesto	Concentración (g/kg, bs)*
Flavanoles	
Catequina	0.06–0.63
Epicatequina	1.53–4.36
Total flavanoles	0.60–4.94
Flavonoles	
Rutina	0.09–0.70
Total flavonoles	0.09–0.70
Antocianidinas	0.040–0.050
Proantocianidinas	
Prodelfinidinas	7.00–7.01
Proantocianinas	2.50–2.59
Total proantocianidinas	6.00–20.10
Ácidos hidroxibenzoicos (AHBs)	
Ácido protocatéquico	0.09–4.70
Total ácidos (AHBs)	0.09–4.70
Ácidos hidroxicinámicos (AHCs)	
Ácido caféico (AC)	0.09–2.66
Ácido ferúlico (AF)	0.05–0.26
Ácido <i>p</i> -cumárico (ApC)	0.08–0.16
Ácido 5-CQ (ACL)	2.38–12.80
Ácido 4-CQ	0.30–0.30
Ácido 3-CQ	0.20–0.20
Ácido 3,5-diCQ	0.20–1.13
Ácido 3,4-diCQ	0.90–4.45
Ácido 4,5-diCQ	0.00–1.22
Ácido 5-FQ	0.00–0.20
Ácido <i>p</i> CQ	0.08–0.60
Total AHCs	2.98–15.98

*Datos obtenidos de: (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991b; De Colmenares *et al.*, 1994; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2006; Ramírez-Coronel *et al.*, 2007; Torres-Mancera *et al.*, 2011)

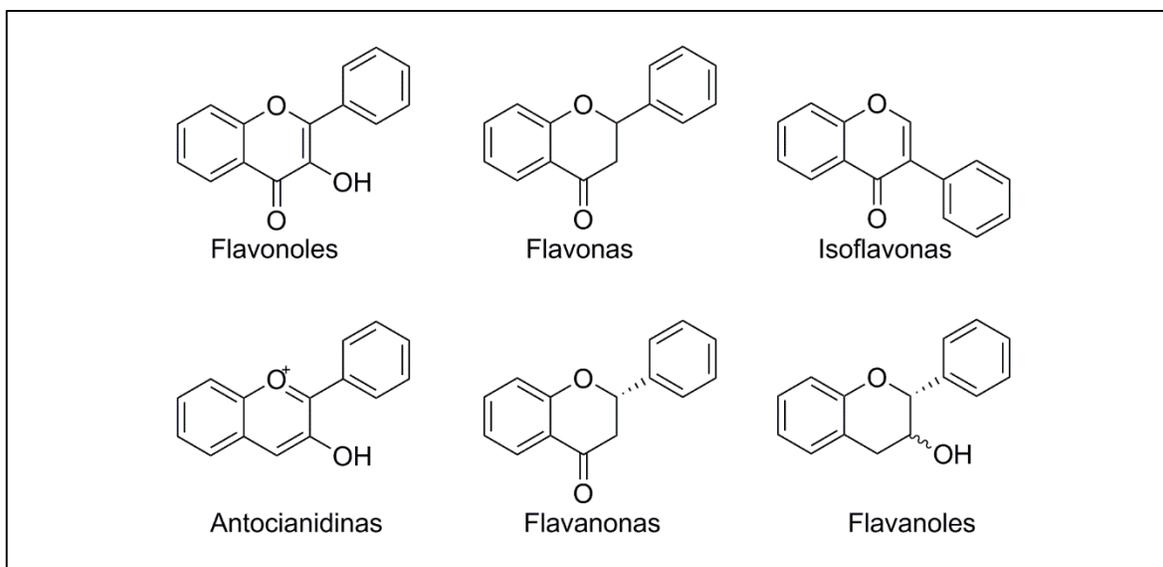


Figura 2.1. Estructura genérica de las principales subclases de flavonoides.

Se han identificado diferentes clases de flavonoides y compuestos derivados en la PC. Ramírez (1987) analizó los compuestos fenólicos presentes en los extractos metanólicos de PC. Utilizando cromatografía en papel, identificó tentativamente compuestos pertenecientes a los grupos de catequinas, leucoantocianidinas, antocianinas y derivados glucósidos de flavonoles. En estudios posteriores, utilizando HPLC identificó y cuantificó los flavonoides catequina, epicatequina y rutina (Ramírez-Martínez, 1988).

Más recientemente, Ramírez-Coronel *et al.* (2004) analizaron los compuestos fenólicos de la PC mediante tiólisis directa seguida de HPLC. Ellos encontraron flavanoles en forma de monómeros y proantocianidinas. Las unidades constitutivas de las proantocianidinas fueron principalmente epicatequina (más del 90%). También encontraron pequeñas cantidades de flavonoles y antocianidinas (0.4-0.6 g/kg, bs).

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos que poseen un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo y un grupo carboxilo (Figura 2.2). Los ácidos fenólicos naturales se clasifican de acuerdo a su estructura en ácidos hidroxibenzoicos (AHBs) y ácidos hidroxicinámicos (AHCs). Los ácidos fenólicos pueden encontrarse libres o en forma de

ésteres de azúcares, como la glucosa o ácidos orgánicos, como el ácido quínico o tartárico (Robbins, 2003).

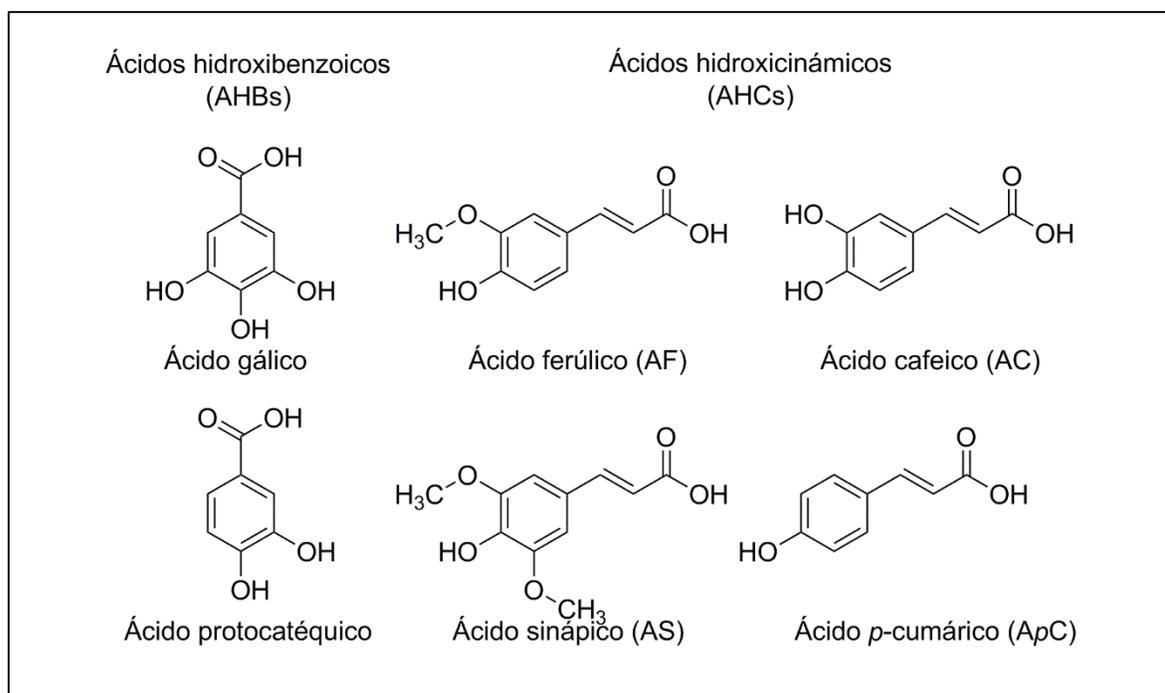


Figura 2.2 Estructura de los principales ácidos fenólicos.

Los ácidos fenólicos de la PC corresponden, principalmente a AHCs. El único AHB identificado en la PC es el ácido protocatéquico, el cual se encuentra en una concentración de 0.09 a 4.70 mg/kg, bs (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a).

Los AHCs en la PC están en forma de ácidos libres, ésteres solubles y ésteres insolubles. Se han identificado y cuantificado ácido cafeico (AC), ácido ferúlico (AF), ácido *p*-cumárico (ApC) y los derivados: ácido 3-cafeoil quínico (3-CQA), ácido 4-cafeoil quínico (4-CQA), ácido 5-cafeoil quínico (5-CQA), ácido 3,5-dicafeoil quínico (3,5-diCQA), ácido 3,4-dicafeoil quínico (3,4-diCQA), ácido 4,5-dicafeoil quínico (4,5-diCQA), ácido 5-feruloil quínico (5-FQA) y ácido *p*-cumaroil quínico (*p*CQA) (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Benoit *et al.*, 2006; Ramírez-Coronel *et al.*, 2007; Torres-Mancera *et al.*, 2011).

El ACL es el ácido fenólico más abundante en la PC (Figura 2.3). Se encuentra en una concentración de 2.4 a 12.8 g/kg de PC (bs) y representa del 51 al 91% de los AHCs presentes en la PC (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991b; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Ramírez-Coronel *et al.*, 2007).

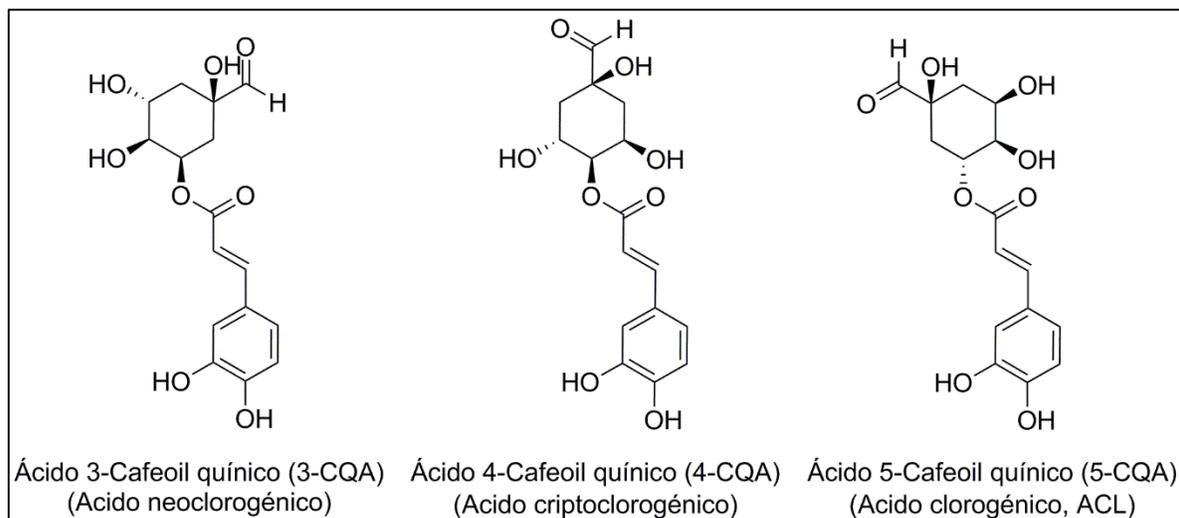


Figura 2.3 Isómeros del ácido clorogénico (ACL)

Diversos estudios *in vitro*, *in vivo* y epidemiológicos han atribuido beneficios potenciales del consumo de ACL para la salud humana. Estos beneficios potenciales se basan en sus propiedades antioxidantes, antivirales, hipoglucémicas y hepatoprotectivas (Marques y Farah, 2009 y las referencias citadas). Por ello, el ACL tiene aplicaciones potenciales en la industria química, farmacéutica y de alimentos.

Comercialmente, ACL se extrae de granos verdes de café y de algunas plantas medicinales, como la madreselva (*Lonicera japonica*) y el árbol de la gutapercha (*Eucommia ulmoides*) (Chen *et al.*, 2007). Estas plantas deben ser cultivadas específicamente para este propósito, por lo que tienen un valor comercial relativamente alto. El valor comercial del ACL oscila entre 36 y 65,000 USD por kg, dependiendo del grado de pureza (25-95%) (www.alibaba.com; www.sigmaaldrich.com). Por ello, resulta atractivo buscar nuevas fuentes de bajo costo para la obtención de ACL.

2.2 Aprovechamiento de los AHCs de la PC

El aprovechamiento de la PC para la extracción de AHCs y derivados puede ser una alternativa económicamente viable para la producción comercial de estos compuestos. Además, la producción de AHCs a partir de la PC contribuiría a reducir la contaminación generada por la agroindustria cafetalera y se le daría un alto valor añadido a un subproducto pobremente utilizado en nuestro país. De esta manera se pueden obtener beneficios económicos y ecológicos.

El aprovechamiento de los AHCs y derivados comienza por la extracción de los compuestos. Para la aplicación de estos compuestos, generalmente se requiere de operaciones de extracción, concentración y purificación. Finalmente, los AHCs recuperados pueden ser sometidos a tratamientos químicos o biológicos para obtener compuestos con mejores actividades biológicas o de un mayor valor comercial.

2.2.1 Extracción

La extracción de AHCs de la PC para fines analíticos se ha realizado principalmente mediante extracciones líquido-sólido convencionales. Ramirez-Coronel *et al.* (2004) estudiaron la eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos con solventes. Realizaron una serie de extracciones sucesivas con hexano, metanol acidificado y acetona acidificada. El tratamiento con metanol permitió remover del 60 al 66% de los AHCs de la PC, mientras que tras la extracción con acetona la mayor parte de los AHCs (más del 95%) fue removida (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004). Pérez-Morales (2008) evaluó diferentes concentraciones de metanol (60-100%) para la extracción de AHCs de la PC. Posteriormente, evaluó el efecto combinado del tiempo y temperatura de extracción. Las mejores condiciones para la extracción fueron: metanol al 80%, 56 °C y 34 minutos.

Estas metodologías son efectivas para recuperar de manera cuantitativa los AHCs de la PC. Se han utilizado con éxito para el análisis de los compuestos fenólicos de la PC. Sin embargo, para la extracción preparativa de compuestos fenólicos se prefieren metodologías rápidas y fácilmente escalables, como la extracción asistida por ultrasonido (EAU), la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción con fluidos supercríticos (EFSC).

La EAU se ha utilizado exitosamente para la extracción de ACL a partir de hojas de *Eucommia ulmoides* y de tabaco (Li *et al.*, 2005; Mazvimba *et al.*, 2012). La EAM ha sido utilizada para la extracción de ACL a partir de capullos de *Lonicera japonica* y de granos verdes de café (Zhang *et al.*, 2008a; Upadhyay *et al.*, 2012). La EFSC se ha utilizado para extraer ACL de granos verdes de café (De Azevedo *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguna de estas metodologías ha sido utilizada para la extracción de AHCs o ACL de la PC.

La extracción líquido sólido (convencional o acelerada) se puede utilizar para extraer los AHCs libres y los ésteres solubles, como el ACL y sus isómeros. Sin embargo, existe una fracción de AHCs que se encuentran esterificados a los polímeros de la PC y solo pueden ser extraídos mediante una hidrólisis. La extracción de los AHCs esterificados generalmente se realiza mediante una hidrólisis alcalina. Torres-Mancera *et al.* (2011) reportaron la composición de AHCs libres y esterificados en la PC. Para ello compararon la cantidad de AHCs extraídos por una hidrólisis alcalina, con los obtenidos por una solución de metanol al 80%. De acuerdo con sus resultados, la mayor parte de los AHCs (83.7%) se encuentran en forma de ésteres insolubles en la PC.

La extracción enzimática de AHCs esterificados puede ser una alternativa viable a los procesos tradicionales de hidrólisis química. Benoit *et al.* (2006) usaron una feruloil esterasa tipo B (FAE-B) para extraer los AHCs totales de la PC. Con este tratamiento extrajeron de manera cuantitativa el AC, el 73% del ApC y el 45% del AF de los AHCs de la PC. Torres-Mancera *et al.* (2011) usaron un extracto crudo producido por *Rhizomucor pusillus* en FMS y una pectinasa comercial para la extracción de AHCs de la PC. Usando esta combinación lograron extraer el 54.4% del ACL, 19.8% del AF, el 7.2% del ApC y el 2.3% del AC esterificados de la PC. En estudios posteriores, usando una combinación de extractos enzimáticos producidos por *Aspergillus tamarii*, *Rhizomucor pusillus* y *Trametes* sp. consiguieron extraer el 36.1% y el 33% del ACL y el AC esterificados, respectivamente (Torres-Mancera *et al.*, 2013).

2.2.2 Aislamiento y purificación

Los extractos obtenidos de la PC por los métodos antes mencionados, consisten en soluciones diluidas de AHCs con diferentes impurezas. Dependiendo de la aplicación en la que serán utilizados, los extractos ricos en AHCs requieren de cierta concentración y pureza.

Hasta el momento, no existen reportes sobre la purificación de AHCs extraídos de la PC. Pero existen reportes de la purificación de ACL y AF extraídos de otras fuentes.

Los procedimientos tradicionales para el aislamiento y purificación de AHCs incluyen extracciones líquido-líquido y cristalizaciones (Hulme, 1953; Rakotomalala, 1992). Sin embargo, estos procedimientos son largos, laboriosos y consumen grandes cantidades de solventes orgánicos. Para el aislamiento de estos compuestos a nivel laboratorio, los métodos cromatográficos presentan algunas ventajas, como la rapidez y la facilidad para escalar y automatizar el proceso.

Lu *et al.* (2004) purificaron ACL a partir de un extracto de *Lonicera japonica* usando cromatografía contracorriente de alta velocidad (HSCCC) con un sistema bifásico compuesto de n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5). Ellos obtuvieron 16.9 mg de ACL con una pureza del 94.8% a partir de 300 mg de extracto crudo, con una recuperación del 90%, aproximadamente. La cromatografía HSCCC se utilizó también para purificar simultáneamente AC, ACL y luteolina a partir de un extracto crudo de *Caulis loniceræ*. Usando un sistema bifásico acetato de etilo-etanol-agua (4:1:5), a partir de 110 mg de extracto crudo recuperaron 7.2 mg de AC, 15.7 mg de ACL y 18.8 mg de luteolina con una pureza de 95.55%, 97.24% y 98.11%, respectivamente.

Zhang *et al.* (2008b) desarrollaron un método de separación preparativa para la recuperación de ACL a partir de extractos crudos de *Lonicera japonica* mediante su adsorción en la resina macroporosa HPD-850. En las condiciones óptimas, el contenido de ACL del extracto se incrementó de 11.2 a 50% con una recuperación del 87.9%. Sun *et al.* (2013) usaron la adsorción en la resina macroporosa X-5 para la purificación de ACL a partir de extractos de manzanas inmaduras. Después de la separación cromatográfica, el contenido de ACL fue de 15.20%, 2.79 veces más alto que el contenido en el extracto crudo, con una recuperación del 89.16%.

2.2.3 Transformación enzimática de AHCs

Los AHCs son compuestos naturales con actividades biológicas importantes. Sin embargo, debido a su carácter polar, las aplicaciones de los AHCs en sistemas con lípidos dispersos son limitadas. La hidrofobicidad de los AHCs puede ser mejorada mediante su

lipofilización química o enzimática. La lipofilización consiste en esterificar el grupo carboxilo del AHC con un alcohol graso para obtener una molécula anfifílica, la cual conserva sus propiedades funcionales originales (Figueroa-Espinoza y Villeneuve, 2005).

La lipofilización enzimática presenta algunas ventajas sobre la lipofilización química, tales como: condiciones de reacción más suaves, menos reacciones secundarias y menor cantidad de subproductos, reducción de pasos intermedios y de pasos de purificación, menor consumo de energía y menor formación de residuos (Figueroa-Espinoza y Villeneuve, 2005).

Varios autores han trabajado en la síntesis enzimática de derivados lipofílicos de AHCs. Guyot *et al.* (1997) estudiaron la síntesis enzimática de ésteres de ácidos fenólicos con alcoholes grasos catalizada por una lipasa inmovilizada de *Candida antarctica* en un sistema libre de solvente. Ellos observaron tasas de reacción muy bajas a pesar de la alta actividad del catalizador. Además, encontraron que la presencia de un doble enlace conjugado en la cadena lateral de un anillo aromático *para*-hidroxilado, como en el AC y el AF, inhibe completamente a la lipasa. Ellos asociaron este fenómeno a un efecto electrónico más que a un efecto estérico, ya que la esterificación del ácido 3,4 di-metoxi-cinámico fue posible, mientras que la del AC y AF no.

Stamatis *et al.* (1999) estudiaron la esterificación de ácidos fenólicos con 1-octanol catalizada por lipasas inmovilizadas de *C. antarctica* y *Rhizomucor miehei*. Ellos observaron que la lipasa de *C. antarctica* es capaz de catalizar la esterificación del ácido *p*-hidroxifenilacético y el ácido cinámico con altas tasas de reacción y altos rendimientos. Sin embargo, cuando el sustrato es un derivado del ácido benzoico o cinámico con una sustitución hidroxilo en la posición *orto* o *para* (como en el AC, AF, ApC y AoC) inhibe la actividad enzimática. Cuando la cadena lateral del sustrato está saturada (como en el ácido *p*-hidroxifenilacético), la *para*-hidroxilación no tiene efecto sobre la actividad enzimática.

Una alternativa para la síntesis enzimática de ésteres de AHCs consiste en el uso de una feruloil esterasa (FAE) como catalizador. Giuliani *et al.* (2001) estudiaron la síntesis de ferulato de pentilo catalizada por una FAE-A de *A. niger* en un sistema de microemulsión agua en aceite. La reacción alcanzó un alto rendimiento (50-60%) en un tiempo corto (8 h). Las feruloil esterases también han sido utilizadas en la síntesis de ésteres de AHCs con monosacáridos (Topakas *et al.*, 2005; Couto *et al.*, 2010), oligosacáridos (Couto *et al.*, 2011)

y glicerol (Tsuchiyama *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2008). Otra aplicación potencial para los AHCs es la síntesis de ésteres de AHCs con alcoholes aromáticos, como el ester fenético del ácido ferúlico (FAPE) y el ester fenético del ácido cafeico (CAPE). Estos compuestos tienen importantes actividades biológicas y aplicaciones industriales potenciales.

2.3 Síntesis de CAPE

El CAPE (Figura 2.4) es uno de los principales compuestos activos del propóleo. El CAPE presenta actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, inmunomoduladora, antiangiogénica, anti-invasiva, anti-metastásica, carcinostática, neuroprotectora, hepatoprotectora y cardioprotectora (Watanabe *et al.*, 2011; Tolba *et al.*, 2013).

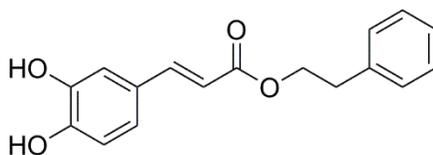


Figura 2.4 Estructura del ester fenético del ácido cafeico (CAPE).

Debido a sus actividades biológicas, el CAPE tiene aplicaciones potenciales en medicina y cosmetología. El uso del CAPE se ha patentado para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, de desórdenes neurodegenerativos y cardiovasculares, así como de enfermedades alérgicas. También se ha protegido su uso como agente antiviral en el tratamiento de virus como el HIV y el virus de la influenza. Además, se ha patentado la aplicación del CAPE como agente antimicrobiano en la elaboración de sutura, y como ingrediente en productos para el cuidado de la piel, para la prevención de la obesidad y para la regulación del crecimiento del cabello. La Tabla 2.4 muestra algunas de las patentes registradas en los últimos 15 años sobre las aplicaciones del CAPE. El número de patentes solicitadas refleja el interés industrial sobre este compuesto.

Tabla 2.4 Patentes seleccionadas sobre los usos del CAPE

No. Patente	Año	Título	Solicitante(s)
KR20130057178	2013	Antimicrobial suture for medical use with CAPE, pinocembrin and manufacturing method thereof	Korea Institute of Ceramic Engineering and Technology [KR]
US8575215	2013	Use of CAPE for manufacturing a medicament for treating neurodegenerative and cardiovascular disorders	Yansheng Du [USA]
EP2420289	2012	Composition of CAPE and one of catechin, kaempherol and myricetin for potentiating antitumour effect and for treating tumours	Grindeks JSC [LV]
KR101168050	2012	Food composition for obesity prevention or pharmaceutical composition for obesity treatment containing CAPE	SNU R&D Foundation [KR]
EP2331091	2011	Pharmaceutical combination of 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil and caffeic acid phenethyl ester for oral treating of tumors	Grindeks JSC [LV] Chemco Ventures Ltd [CY]
JP4212052	2009	Skin care preparation	Mitsuda Yasuhiro
US20080254055	2008	Compositions for regulation of hair growth	Procter & Gamble [USA]
TWI281859	2007	Medical composition for treating respiratory allergic disease	Fu Jen Catholic Univ. [TW]
KR20050055479	2005	MMP-9 inhibitor containing caffeic acid or caffeic acid phenethyl ester	Kim Cheorl-Ho [KR] <i>et al.</i>
JP4036327	2004	Anti-influenza virus agent	Ueshima Coffee Co., Ltd. [JP]
JP2003119169	2003	Compound having cytotoxic activity and pharmaceutical composition containing the same as active ingredient	Kadota Shigetoshi [JP]
WO2003011276	2003	NF- κ B inhibitor	Ms Science Corp. [JP]
EP1166782	2002	Anti-retroviral pharmaceutical compositions	Yang Chi Chiang [TW]
US6689811	2002	Method of using caffeic acid phenethyl ester and analogs thereof as radiation sensitizers	Wake Forest University [USA]

La empresa Manuka Health Ltd, de Nueva Zelanda, comercializa extractos de propóleo ricos en CAPE con el nombre de Bio30TM. Estos extractos se venden en forma de extractos líquidos, cápsulas y tabletas. Estos productos están destinados a fortalecer el sistema inmune (<http://www.bio30.com>). Sin embargo, estudios *in vitro* demuestran el potencial de estos extractos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Demestre *et al.*, 2009; Catchpole *et al.*, 2015).

Actualmente, el CAPE se extrae de fuentes naturales, como el propóleo. El proceso es sencillo, pero lento. Además, la purificación del CAPE obtenido de fuentes naturales es complicada. Por ello, se han buscado métodos para la síntesis de este compuesto (Ye *et al.*, 2012).

2.3.1 Síntesis química

Se han reportado varios métodos para la síntesis química del CAPE. El CAPE puede ser sintetizado por esterificación entre el ACL y el 2-FE, o por sustitución de sus derivados halogenados.

Grunberger *et al.* (1988) reportaron por primera vez la síntesis química del CAPE mediante la esterificación entre AC y 2-FE catalizada por ácido *p*-toluenosulfónico en benceno. Esta reacción se llevó a cabo a reflujo durante 3-4 días y tuvo un rendimiento del 40%. Chen *et al.* (1996) sintetizaron CAPE usando AC y 2-FE como sustratos y *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo condensador. La reacción se llevó a cabo durante 8 h a temperatura ambiente usando tetrahidrofurano (THF) como solvente. Después de la fraccionación por cromatografía en columna y la recristalización, se obtuvo CAPE puro con un rendimiento del 38%.

Hashimoto *et al.* (1988) reportaron la síntesis de CAPE a partir de AC y 2-bromoetil benceno usando NaOH como catalizador y hexametilfosforamida (HMPA) como solvente. La reacción se llevó a cabo durante 50 h a temperatura ambiente. El producto se recuperó por extracciones líquido-líquido, cromatografía en columna y recristalización, con un rendimiento del 70%.

Chen *et al.* (1999) sintetizaron CAPE a partir de AC y 2-FE vía cloruro de AC en una reacción en dos etapas. El AC se calentó con exceso de SOCl₂ durante una hora a temperatura

de reflujo. El exceso de SOCl_2 se eliminó por destilación al vacío para obtener el compuesto intermediario (cloruro de acilo). Se agregó 2-FE, piridina y nitrobenzono. La mezcla se dejó reaccionar 1 h a temperatura ambiente. El producto se purificó en una columna de sílica usando diclorometano/hexano como eluyente para obtener un compuesto puro con un rendimiento del 50%. En estudios posteriores, el mismo grupo mejoró este método. El AC (1.02 g) se disolvió en dioxano (25 mL), se agregó el SOCl_2 (0.6 mL). La mezcla se calentó a reflujo durante 1 hora y se agregó el 2-FE (1.0 mL). Se calentó durante 1 h más y la solución se concentró al vacío. El producto concentrado se separó en una columna de sílica usando acetato de etilo-hexano (1:1) como eluyente, para obtener un compuesto puro (1.37 g) con un rendimiento del 86% (Lee *et al.*, 2000).

En resumen, el CAPE puede obtenerse por síntesis química con un rendimiento variable (38-86 %). Los métodos de síntesis directa (AC + 2-FE) son sencillos, pero lentos (hasta 4 días de reacción) y con un bajo rendimiento (38-40%). Los métodos basados en sustratos halogenados son más rápidos y con un mayor rendimiento (50-86%). Sin embargo, el principal inconveniente de los métodos químicos es el uso de reactivos, solventes y catalizadores tóxicos cuyo uso está restringido para aplicaciones médicas o de alimentos.

2.3.2 Síntesis enzimática

Kishimoto *et al.* (2005) reportaron por primera vez la síntesis enzimática de CAPE. Ellos utilizaron una clorogenato hidrolasa de *Aspergillus japonicus* para catalizar la síntesis de CAPE a partir de ACL y 2-FE, mediante una reacción de transesterificación; a partir de ACL y 2-bromoetil benceno, por sustitución de bromo; y a partir de AC y 2-FE o 2-bromoetil-benceno por una reacción de condensación. El mejor rendimiento lo obtuvieron con la reacción de transesterificación (50%), mientras que la sustitución de bromo tuvo un rendimiento del 4.7% y la reacción de condensación tuvo un rendimiento del 13%.

Stevenson *et al.* (2007) usaron una lipasa inmovilizada de *C. antarctica* (Novozym® 435) como catalizador para la síntesis de ésteres entre AHCs y alcoholes aromáticos. Las reacciones se llevaron a cabo a 60 °C durante 15 días, utilizando *tert*-butanol como solvente y en presencia de tamices moleculares. Ellos observaron que la estructura del ácido tiene un gran efecto sobre la tasa de reacción. Por ejemplo, la esterificación del ácido cinámico ocurre un orden de magnitud más rápido que la esterificación del AC. En las condiciones estudiadas,

se obtuvo un rendimiento de alrededor del 36% en 360 h de reacción para la síntesis de CAPE a partir de AC y 2-FE.

Widjaja *et al.* (2008) mejoraron las condiciones de reacción para la síntesis enzimática de CAPE. Ellos probaron diferentes solventes, temperaturas, concentraciones de sustratos y de enzima y velocidades de agitación. En las mejores condiciones de reacción (2 mg de AC, 125 mg de 2-FE y 30 mg de Novozym® 435 en 3 mL de isooctano a 70 °C con una agitación de 50 rpm) ellos obtuvieron una conversión cuantitativa en 48 h.

Chen *et al.* (2011a) desarrollaron un proceso acelerado por ultrasonido para la síntesis enzimática de CAPE. En las condiciones óptimas (1 mM AC, 71 mM 2-FE, 2938 PLU, un poder ultrasónico de 2 W/cm² y un tiempo de incubación de 9.6 h) obtuvieron una conversión del 93.08%. El mismo grupo de investigación utilizó un método similar para la síntesis en continuo de CAPE. Ellos usaron un reactor empacado con Novozym® 435 el cual colocaron dentro de un baño ultrasónico con control de temperatura. Los reactivos (AC y 2-FE) se disolvieron en *tert*-butanol/isooctano (1:9). La mezcla se bombeó continuamente a través del reactor. En las mejores condiciones de reacción, obtuvieron una conversión del 92.11% (Chen *et al.*, 2011b).

Ha *et al.* (2012) estudiaron la síntesis enzimática de CAPE usando líquidos iónicos como solvente. Ellos evaluaron varias lipasas y varios líquidos iónicos. Ellos seleccionaron el 1-etil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil) imida ([Emim] [Tf₂N]) como medio de reacción, y la lipasa inmovilizada de *C. antarctica* (Novozym® 435) como catalizador. Posteriormente, optimizaron las condiciones de reacción usando la metodología de superficie de respuesta. En las condiciones óptimas (60 h, 73.7 °C, relación molar 2-FE/AC = 27.1:1 y relación enzima/AC = 17.8:1) obtuvieron un rendimiento del 96.6% (Ha *et al.*, 2013).

En resumen, el CAPE puede obtenerse mediante síntesis enzimática. Algunos métodos publicados conducen a altos rendimientos (90-100%). Sin embargo, estos métodos tienen algunos inconvenientes, como los largos tiempos de reacción (48-60 h) y las grandes cantidades de biocatalizador necesarias (15-18 mg de catalizador/mg de AC). Esto puede estar asociado a la baja afinidad entre el biocatalizador y los sustratos utilizados, así como a la baja solubilidad de los mismos.

2.4 Enzimas utilizadas para la transformación de AHCs

Varias enzimas han sido utilizadas como catalizadores para la transformación de AHCs, entre las que destacan las lipasas, feruloil esterases y clorogenato hidrolasas. Estas enzimas pueden ser utilizadas en forma de extractos crudos o como enzimas puras. Además, pueden utilizarse en su forma libre o inmovilizada. A continuación, se describirán brevemente las principales enzimas usadas en la modificación de AHCs

2.4.1. Lipasas

Las lipasas, o triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3) son una clase de hidrolasas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos a glicerol y ácidos grasos en una interfase agua-aceite Treichel *et al.* (2010). Estas reacciones hidrolíticas pueden invertirse en ambientes microacuáticos, como en las reacciones en solventes orgánicos, dando lugar a reacciones de esterificación y transesterificación (Gupta *et al.*, 2015).

Las lipasas son producidas por animales, plantas y microorganismos. Para aplicaciones industriales, son preferibles las lipasas microbianas debido a su estabilidad, selectividad y amplia especificidad de sustrato. Muchos microorganismos son productores de lipasas extracelulares. Dentro de las lipasas comerciales más importantes encontramos las lipasas producidas por hongos de los géneros *Aspergillus* sp. y *Rhizomucor* sp., levaduras del género *Candida* sp. y bacterias de los géneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., y *Burkholderia* sp. (Treichel *et al.*, 2010).

Estructuralmente, las lipasas están compuestas por un núcleo formado predominantemente por hojas β rodeadas de hélices α . El sitio activo de las lipasas está formado por una triada catalítica que consiste en los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico o glutámico. El residuo serina nucleófilo del sitio activo se encuentra en una curva cerrada entre una hoja β y una hélice α en una secuencia pentapeptídica altamente conservada (Gly-X-Ser-X-Gly). Otra característica de las lipasas es la presencia de una “tapa” compuesta por una secuencia peptídica anfifílica en forma de α -hélice, la cual cubre el sitio activo. La lipasa B de *C. antarctica* (CALB) tiene algunas diferencias estructurales con el resto de las lipasas. CALB no tiene la secuencia pentapeptídica conservada (Gly-X-Ser-X-Gly) alrededor

del sitio activo. Además, CALB tiene una “tapa” muy pequeña y simple, la cual no aísla completamente el centro activo de la enzima en la forma cerrada (Kapoor y Gupta, 2012).

La mayoría de las lipasas presenta activación interfacial, un fenómeno por el cual las lipasas expresan una mayor actividad catalítica cuando la reacción se lleva a cabo en una interface acuoso/orgánica. La hipótesis más aceptada para explicar la activación interfacial dice que la interacción con una fase hidrofóbica producen la apertura de la “tapa” que cubre el sitio activo, haciéndolo más accesible para el sustrato (Adlercreutz, 2013).

Las lipasas son biocatalizadores quimio, regio y estereoselectivos. Por ello se usan frecuentemente en diversos sectores industriales como en la formulación de detergentes, industria oleoquímica, producción de biocombustibles, alimentos y lácteos, agroquímicos, fabricación de papel, nutrición, cosméticos y productos farmacéuticos (Gupta *et al.*, 2015).

La mayoría de las aplicaciones de las lipasas en reacciones de síntesis requieren de ambientes no-acuosos. Los solventes no acuosos tienen la ventaja de disolver compuestos hidrofóbicos, modifican el equilibrio termodinámico hacia las reacciones de síntesis en lugar de las de hidrólisis, reducen las reacciones secundarias en las que interviene el agua, previenen la contaminación por microorganismos, modifican la selectividad de las enzimas hacia ciertos sustratos, facilitan la separación y reutilización de las enzimas y pueden mejorar la estabilidad térmica de las mismas (Salihu y Alam, 2015).

La estabilidad de las enzimas en solventes orgánicos depende en gran medida de las propiedades del solvente. La mayoría de las lipasas son activas y estables en solventes orgánicos anhidros. Sin embargo, las lipasas son insolubles en este tipo de medios. Por ello, se han desarrollado varias técnicas para modificar estas enzimas y volverlas solubles en solventes orgánicos. Las lipasas solubles son atractivas debido a su alta actividad comparada con la de las lipasas insolubles. Además, las enzimas solubles son ópticamente transparentes, lo que permite la caracterización espectroscópica de la reacción (Sharma y Kanwar, 2014).

Por otra parte, la inmovilización de enzimas y en particular de lipasas usadas en síntesis orgánica ofrece algunas ventajas técnicas. La inmovilización puede mejorar la estabilidad e incrementar la actividad de las lipasas, en comparación con la enzima libre.

Además, la inmovilización facilita la reutilización de la enzima y la recuperación del producto, mejorando la economía del proceso (Adlercreutz, 2013).

Novozym 435® es una preparación comercial de lipasa B de *C. antártica* (CALB) inmovilizada en una resina acrílica. Esta enzima ha sido utilizada para catalizar la síntesis de ésteres de ácidos fenólicos con alcoholes de cadena larga. Se han obtenido buenos rendimientos (50-98%) para los ácidos cinámico, di-hidrocafeico, 3,4 di-metoxicinámico y 3,4 di-hidroxifenil acético. Sin embargo, la presencia simultánea de 2 sustituciones hidroxilo en el anillo aromático y un doble enlace conjugado en la cadena lateral (como en el AC) inhiben completamente la enzima (Guyot *et al.*, 1997).

Por otro lado, la esterificación de AC y 2-FE catalizada con Novozym® 435 se ha llevado a cabo con altas conversiones y rendimientos (92-100%). Sin embargo, para obtener estos resultados se requiere de una gran cantidad de catalizador (15-17.8 mg de biocatalizador/mg AC) (Widjaja *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Ha *et al.*, 2012). Esto probablemente se debe a la baja afinidad del biocatalizador por el sustrato.

2.4.2. Feruloil esterasas

Las feruloil esterasas (FAEs) son una subclase de las carboxil esterasas (3.1.1.73) que son capaces de hidrolizar los enlaces éster entre AHCs y azúcares presentes en la pared celular de las plantas (Gopalan *et al.*, 2015). Las FAEs se han clasificado en 4 subclases (A, B, C y D) de acuerdo con su capacidad de utilización de sustratos y apoyado por la información sobre la similitud de sus secuencias primarias (Crepin *et al.*, 2004).

Las FAEs tipo A tienen preferencia hacia los ácidos fenólicos que tienen sustituyentes metoxilo, especialmente en la posición *meta*, como el AF y el AS. Las FAEs tipo B tienen preferencia hacia los sustratos con una o dos sustituciones hidroxilo, como el AC y el ApC. Las FAEs tipo A y D son capaces de liberar pequeñas cantidades de diferulatos de la pared celular. Las lipasas C y D tienen amplia especificidad hacia ésteres sintéticos de AHCs [sinapato de metilo (MS), *p*-cumarato de metilo (MpC), ferulato de emtilo (MF) y cafeato de metilo (MC)], y sólo difieren en su capacidad para liberar diferulatos. En cuanto a los sustratos naturales, las FAEs tipo A son activas sólo sobre sustratos que contienen AF unido por enlaces éster O-5, pero no sobre los sustratos con un AF unido por enlaces O-2 a la L

arabinofuranosa. Las FAEs tipo B, C y D son activas en ambos tipos de sustratos, los que contienen AF unido mediante enlaces O-5 y O-2 a la arabinofuranosa (Crepin *et al.*, 2004; Topakas *et al.*, 2007).

Las FAEs son producidas principalmente por hongos filamentosos y bacterias en cultivos sumergidos. Los medios de cultivo utilizados generalmente contienen ésteres solubles de AF (MF, ferulato de etilo, etc.) o residuos agroindustriales con alto contenido de AF esterificado (salvado de trigo, xilano de hojuelas de avena, pulpa de remolacha azucarera, etc.). Los títulos de actividad en estas condiciones suelen ser muy bajos, generalmente menores a 1 U/mL de medio de cultivo (Faulds y Williamson, 1994; Bonnina *et al.*, 2001; Shin y Chen, 2006; Mukherjee *et al.*, 2007).

Para mejorar la producción de FAE, varios autores han propuesto el uso de la FMS. Se han encontrado ventajas de la FMS sobre el cultivo sumergido, como una mayor producción enzima por g de sustrato, o menor tiempo para alcanzar la máxima actividad enzimática. Sin embargo, los títulos de actividad producidos por FMS siguen siendo bajos (0.3-1 U/g de soporte) (Asther *et al.*, 2002; Hegde y Muralikrishna, 2009).

Las técnicas moleculares han sido utilizadas exitosamente para mejorar la producción de FAEs. Por ejemplo, Levasseur *et al.* (2004) clonaron el gen *faeB* de *A. niger* BRFM13 y lo expresaron en una cepa de *A. niger* deficiente de proteasas. Con este sistema de expresión homólogo lograron incrementar la producción de FAE 16 veces con respecto a la cepa nativa. Sin embargo, la actividad en el medio de cultivo fue de alrededor de 1 U/mL. Gong *et al.* (2013) clonaron el gen *AufaeA* de *A. usami*, que codifica para una FAE tipo A y lo expresaron heterológamente en *Pichia pastoris*. Después de 72 horas de inducción con metanol (concentración final = 1% v/v), la cepa recombinante produjo 10.76 U/mL de medio de cultivo. Zhou *et al.* (2015) modificaron una cepa de *P. pastoris* a la cual le insertaron 2 copias del gen *AnFaeA* que codifica para una FAE tipo A de *A. niger*. En las condiciones óptimas de inducción, la levadura modificada produjo 15.49 U FAE/mL de medio de cultivo.

Las principales aplicaciones potenciales de las FAEs se encuentran en la extracción de AHCs a partir de residuos agroindustriales y como coadyuvantes en la hidrólisis enzimática de materiales lignocelulósicos para la producción de biocombustibles (Gopalan *et al.*, 2015). Algunos autores han estudiado el uso de las FAEs como biocatalizadores en

reacciones de síntesis. Las FAEs han sido utilizadas en la síntesis de ésteres de AHCs con alcoholes alifáticos (Giuliani *et al.*, 2001), monosacáridos (Topakas *et al.*, 2005; Couto *et al.*, 2010), oligosacáridos (Couto *et al.*, 2011) y glicerol (Tsuchiyama *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2008). Sin embargo, la falta de fuentes comerciales ha limitado la aplicación de las FAEs como biocatalizadores.

Actualmente, solo existen dos FAEs disponibles en el mercado. Estas enzimas son vendidas como productos de especialidad a un alto precio (40-80 €/mg, <https://www.nzytech.com>). Por otra parte, se sabe que algunas preparaciones comerciales multienzimáticas tienen cantidades importantes de FAE (Couto *et al.*, 2010).

2.4.3. Clorogenato hidrolasas

La clorogenato hidrolasa (EC 3.1.1.42) es una enzima que hidroliza el ácido ACL para formar AC y AQ. Esta enzima también actúa (lentamente) sobre otros ácidos cafeoil-quinicos (Mateos *et al.*, 2009). A diferencia de las FAEs, la clorogenato hidrolasa no actúa sobre ésteres de AF, AS y ApC.

Schöbel y Pollmann (1980) aislaron y caracterizaron por primera vez una esterasa específica capaz de hidrolizar el ACL a partir de una pectinasa comercial de *A. niger*. La enzima fue inactiva sobre acetiltiocolina, butirato de etilo, butirato de metilo, actato de 1-naftilo, acetato de 2-naftilo, etil éster de ácido DL-*p*-amigdalico y aceite de girasol. Sin embargo, esta enzima no fue probada con otros ésteres de AHCs o de AHBs. Okamura y Watanabe (1982) purificaron y caracterizaron una esterasa de *A. japonicus* producida en FMS sobre salvado de trigo. La enzima purificada fue capaz de hidrolizar ésteres del AC (ACL y ácido caftárico), ésteres de ApC (tartrato de *p*-cumarilo) y ésteres del ácido cinámico (etil y bencil ésteres), pero fue incapaz de hidrolizar ésteres del ácido acrílico o de AHBs.

Asther *et al.* (2005) purificaron y caracterizaron dos esterases producidas por *A. niger* en un cultivo líquido con pulpa de remolacha azucarera como inductor. Una de las enzimas tuvo actividad sobre ACL y sobre ésteres de AHCs (MF, MC, MpC y MS), por lo que fue identificada como una feruloil esterasa (FAE B). La otra enzima sólo fue activa sobre ACL, por lo que fue identificada como clorogenato hidrolasa. Posteriormente, el gen que codifica para esta proteína fue clonado y sobreexpresado homológamente (Benoit *et al.*, 2007).

La producción de clorogenato hidrolasa sólo se ha reportado para algunos hongos del género *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. japonicus*, *A. ochraceus* y *A. sojae* (Schöbel y Pollmann, 1980; Okamura y Watanabe, 1982; Asther *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2008); así como de algunas bacterias como *Acinetobacter* sp., *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus gasseri* (Couteau *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003).

La clorogenato hidrolasa se expresa generalmente con muy bajos títulos de actividad en cepas silvestres. Por ejemplo, se han obtenido actividades de 0.02 a 0.03 U/mL para *A. niger* y *A. sojae* en cultivo líquido (Asther *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2008) y de 0.13 a 1.2 U/g de soporte para *A. japonicus* y *A. ochraceus* en FMS (Okamura y Watanabe, 1982; Ramírez *et al.*, 2008). Por otro lado, usando una cepa modificada de *A. niger* se han obtenido títulos de hasta 8.4 U/mL (Benoit *et al.*, 2007).

La clorogenato hidrolasa se ha utilizado principalmente para controlar la amargura y el oscurecimiento de frutas y vegetales (Mateos *et al.*, 2009) y para la extracción de AC a partir de materiales vegetales como la PC, el bagazo de manzana y las hojas de batata, bardana y artemisa (Yoshimoto *et al.*, 2005; Benoit *et al.*, 2007).

Kishimoto *et al.* (2005) estudiaron la síntesis de CAPE a partir de ACL o AC mediante reacciones de condensación, transesterificación y sustitución de bromo. Kurata *et al.* (2011) sintetizaron 3-ciclohexil-propil-cafeato a partir de ACL mediante dos reacciones consecutivas en un mismo reactor. El ACL fue sometido a una reacción de alcoholisis catalizada por una clorogenato hidrolasa de *A. japonicus*, seguido de una transesterificación con 3-ciclohexil-1-propanol catalizada por una lipasa de *C. antarctica*.

Las aplicaciones de las clorogenato hidrolasas en reacciones de hidrólisis y síntesis son atractivas. Sin embargo la falta de fuentes comerciales de esta enzima dificulta el desarrollo de estas aplicaciones. La clorogenato hidrolasa de *A. japonicus* fue comercializada por Kikkoman Co. durante muchos años. Sin embargo actualmente no se encuentra disponible en catálogos comerciales, y no existe otra clorogenato hidrolasa disponible en el mercado (<http://biochemifa.kikkoman.co.jp>).

2.5 Comentarios finales

La PC es un subproducto agrícola abundante en las zonas cafetaleras de nuestro país. Se han propuesto numerosas aplicaciones para revalorizar este subproducto. Sin embargo, actualmente sólo una fracción de la PC generada es aprovechada, principalmente como abono orgánico.

Una de las aplicaciones potenciales más atractivas consiste en la extracción, purificación y transformación del ACL de la PC. El ACL es el ácido fenólico más abundante de la PC y tiene importantes actividades biológicas. Además, el ACL puede ser transformado química o enzimáticamente a compuestos bioactivos con potenciales aplicaciones industriales, como el AC, AQ y el CAPE.

La síntesis enzimática de CAPE a partir del ACL presente en la PC es una opción interesante para la revalorización de este subproducto. Sin embargo, es necesario desarrollar las metodologías para la extracción, purificación y transformación enzimática de este compuesto.

3. Justificación

La PC es un subproducto abundante en las zonas cafetaleras de México. Una parte de la PC generada se usa en aplicaciones convencionales o de autoconsumo como abono orgánico en los cafetales y producción de setas. Sin embargo, aún existen grandes cantidades de este subproducto que son desaprovechadas. Una de las aplicaciones potenciales más prometedoras de la PC consiste en la extracción, recuperación y transformación de compuestos de alto valor agregado, como los compuestos fenólicos. Adicionalmente, la PC libre de compuestos fenólicos puede ser utilizada como abono orgánico o alimento animal.

El ACL es el ácido fenólico más abundante en la PC. Este compuesto tiene actividades antioxidantes, antivirales, hipoglucémicas y hepatoprotectoras. Además, el ACL puede ser transformado química o enzimáticamente para obtener compuestos con importantes aplicaciones como el AC, el AQ y el CAPE. El CAPE presenta múltiples actividades biológicas, como actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, inmunomodulatoria, antiangiogénica, anti-invasiva, anti-metastásica, carcinostática, neuroprotectora, hepatoprotectora y cardioprotectora. Debido a estas propiedades, el CAPE tiene aplicaciones potenciales en medicina y cosmetología.

En este trabajo se caracterizó el contenido de AHCs solubles e insolubles en la PC de diferentes variedades de café en diferentes estados de madurez, se desarrolló una metodología para la extracción y purificación del ACL de la PC y se estudió la síntesis de CAPE a partir de ACL extraído de la PC usando enzimas comerciales y extractos enzimáticos obtenidos por FMS. Esta estrategia permite revalorizar un subproducto agroindustrial abundante en nuestro país y que actualmente es subutilizado.

4. Hipótesis

Los extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa producidos por hongos filamentosos en fermentación en medio sólido son capaces de catalizar la síntesis de CAPE a partir del ACL presente en la PC.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Desarrollar una estrategia para la producción de CAPE a partir de la PC, basada en la extracción, purificación y biotransformación del ACL con extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el contenido de AHC de la PC proveniente de diferentes variedades de café con tres estados de madurez diferentes con el propósito de extraer el ACL.
2. Desarrollar una estrategia para extraer y purificar el ACL a partir de la PC.
3. Obtener un extracto enzimático con actividad clorogenato hidrolasa producida por un hongo filamentoso en un sistema de FMS.
4. Determinar las condiciones experimentales para la obtención de CAPE a partir de ACL y de extractos de PC ricos en ACL mediante reacciones de hidrólisis, esterificación y/o transesterificación catalizadas por extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa.
5. Modelamiento de la cinética de transformación enzimática de ACL en CAPE.

6. Caracterización y selección del material vegetal

6.1 Resumen

En esta sección se estandarizó una metodología para la extracción y la cuantificación de AHCs solubles e insolubles de la PC. La metodología estandarizada se utilizó para el análisis del contenido de AHCs y derivados en la PC obtenida de frutos de siete variedades de *Coffea arabica* en tres diferentes grados de madurez provenientes de la región cercana a Coatepec, Veracruz. Adicionalmente, se analizó el contenido de AHCs y derivados de una muestra de PC proveniente de un beneficio comercial.

En todas las muestras analizadas, los AHCs se encontraron principalmente en la fracción soluble en metanol acuoso (68-97%). El ACL es el ácido fenólico más abundante en la fracción soluble (94-98%), mientras que el AC fue el ácido fenólico más abundante en la fracción insoluble (72-88%). También se encontraron pequeñas cantidades de AF y ApC. El contenido total de AHCs de la PC se incrementó del estado inmaduro (2.0-10.7 mg/g PC) al estado semi-maduro (7.4-25.5 mg/g PC) pero disminuyó en el estado maduro (3.0-6.5 mg/g PC) para seis de las siete variedades analizadas (todas excepto la variedad Típica).

El mayor contenido de AHCs (25.2-25.5 mg/g PC) se encontró en la PC obtenida de los frutos semi-maduros de las variedades Garnica Rojo y Garnica Amarillo. Mientras que el contenido de AHCs de la muestra comercial de PC (4.4 mg/g PC) estuvo dentro del rango de las pulpas maduras estudiadas.

Finalmente, se seleccionó la PC obtenida del proceso comercial debido a su mayor disponibilidad. Por otra parte, se propone el uso de los frutos inmaduros que no son recolectados al final de la cosecha como una potencial fuente económica de AHCs.

6.2 Introducción

La PC es el subproducto sólido más abundante producido durante el beneficio húmedo del café (Aranda *et al.*, 2004). La PC tiene numerosas aplicaciones potenciales. Sin embargo, actualmente gran parte de la PC generada no se utiliza y representa un problema medioambiental.

Una de las aplicaciones potenciales más prometedoras de la PC consiste en la extracción de compuestos bioactivos presentes en este material, como los compuestos fenólicos. Los AHCs representan del 39 al 49% de los compuestos fenólicos de la PC (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004). Los AHCs pueden estar en su forma libre, en forma de ésteres solubles, como el ACL o ligados covalentemente a los polímeros de la pared celular. Esta fracción (fracción insoluble) no puede ser removida mediante extracciones líquido-sólido con solventes, sino que se requiere de una hidrólisis (química o enzimática) para extraerlos (Torres-Mancera *et al.*, 2011).

El contenido y distribución de los AHCs en la PC pueden diferir radicalmente de una muestra a otra. Esta variabilidad puede deberse al origen del material vegetal (variedad, madurez del fruto, lugar de origen, prácticas agrícolas, etc.), al manejo post cosecha (método de despulpado y de secado, almacenamiento, etc.) así como a las técnicas analíticas utilizadas.

La información disponible sobre el contenido y distribución de los AHCs en la PC es escasa. Los estudios que comparan el contenido de compuestos fenólicos en la pulpa de diferentes variedades de café se limitan al análisis de la fracción soluble de los AHCs (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a). Además, estos estudios solo consideran muestras provenientes de frutos maduros. Por otra parte, los estudios que han caracterizado las fracciones soluble e insoluble se limitan al análisis de muestras provenientes de procesos comerciales, en donde se desconoce el origen del material vegetal (Arellano-González *et al.*, 2011; Torres-Mancera *et al.*, 2011)

En este capítulo se mejoró un método analítico para la extracción y cuantificación de las fracciones solubles e insolubles de los AHCs de la PC. El análisis se aplicó a PC de frutos de siete variedades de *Coffea arabica* en tres diferentes estados de madurez y provenientes de una región cercana a Coatepec, Veracruz.

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Material vegetal

El material vegetal se colectó en diciembre de 2012 en una finca ubicada en el municipio de Xico, Veracruz (latitud = 96° 57' N; longitud = 19° 25' O; altitud ≈ 1,135

m.s.n.m.). Se colectaron frutos de café de siete variedades de *Coffea arabica* (Típica, Bourbon, Mundo Novo, Costa Rica, Oro Azteca, Garnica Rojo y Garnica Amarillo en tres estados de madurez (inmaduro, semi-maduro y maduro). La identificación de las variedades de café y la clasificación por estados de madurez fue realizada de acuerdo a las características físicas de la planta y de los frutos, para esta tarea se contó con la asesoría de personal local capacitado.

Las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio y se mantuvieron en refrigeración hasta su procesamiento antes de 48h. Las frutas se despulparon manualmente y la pulpa obtenida se secó en un secador de charolas con aireación forzada durante 72 h a 25-40 °C. Adicionalmente se obtuvo una muestra proveniente de un beneficio comercial localizado en la misma región. Esta pulpa se secó al sol durante 72 h. La PC seca se molió en un molino de cuchillas y se tamizó para obtener un polvo de tamaño de partícula de 0.15-0.84 mm.

6.3.2 Caracterización física de los frutos de café

Se midió el peso promedio, volumen promedio y el color de los frutos utilizados. El peso promedio se calculó a partir de 100 frutos por triplicado. El volumen promedio se midió por desplazamiento de agua en una probeta graduada de 1 L.

El color exterior de los frutos se evaluó mediante técnicas de análisis de imágenes. Se tomaron fotos de al menos 10 frutos de cada muestra con una cámara digital en condiciones estandarizadas de iluminación y distancia. Las fotografías fueron analizadas usando el programa Fiji (disponible en <http://fiji.sc/Fiji>). Se obtuvo el color promedio de la superficie de cada fruto y este color se separó en sus componentes rojo, verde y azul (R, G y B). Estos valores se usaron para calcular los parámetros r , g y b usando las siguientes ecuaciones:

$$r = \frac{R}{R+G+B}; g = \frac{G}{R+G+B}; b = \frac{B}{R+G+B}$$

En donde R, G y B representan la intensidad de los colores rojo, verde y azul, y r , g y b son los coeficientes tricromáticos normalizados, los cuales son independientes de la intensidad de la luz (Bulanon *et al.*, 2002).

6.3.3 Extracción de los AHCs solubles e insolubles

La extracción de los AHCs solubles se realizó mediante extracciones sucesivas con hexano y metanol, como fue descrito anteriormente (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Arellano-González *et al.*, 2011). Una muestra de 2 g de PC seca se pesó en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. La muestra se extrajo tres veces con 20 mL de hexano durante 30 min a 30 °C y 150 rpm. Los extractos con hexano se desecharon y los sólidos insolubles se extrajeron tres veces con 20 mL de metanol acuoso (80%, v/v) acidificado con 1% (v/v) de ácido acético. La extracción metanólica se llevó a cabo durante 35 min a 55 °C con una agitación de 150 rpm. Los extractos metanólicos fueron centrifugados (8000 rpm, 10 min), filtrados a través de membranas de celulosa regenerada de 0.22 µm y analizadas por HPLC.

Para confirmar la eficiencia de la extracción de AHCs, una muestra de PC (obtenida de un proceso comercial) se sometió a extracciones sucesivas con hexano y metanol acuoso, como se describió antes y cada extracto se analizó por separado.

Los AHCs insolubles se extrajeron mediante hidrólisis alcalina basado en un método anteriormente descrito (Arellano-González *et al.*, 2011; Torres-Mancera *et al.*, 2011) realizando algunas modificaciones: el sólido obtenido después de las extracciones con hexano y metanol fue hidrolizado con 20 mL de NaOH a diferentes concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 M), con EDTA (10 mM) y ácido ascórbico (1% p/v). La mezcla se incubó a 40 °C durante intervalos regulares de tiempo (15, 30, 60, 120 y 240 min) con agitación constante en un agitador orbital (150 rpm). El pH de las muestras se ajustó a 3.0 ± 0.1 con HCl 6M. La mezcla se filtró a través de un filtro de vidrio sinterizado No. 2, el residuo sólido se recuperó, y se extrajo con 10 mL de agua destilada. Los extractos se combinaron, se filtraron a través de membranas de celulosa regenerada de 0.22 µm y se analizaron por HPLC. Se prepararon controles con ACL como estándar interno para calcular la recuperación de la técnica. Todas las extracciones se hicieron por triplicado y en la oscuridad. Los extractos se conservaron a -18 °C y protegidos de la luz hasta su análisis.

6.3.4 Análisis por HPLC

El análisis de AHCs se realizó en un sistema HPLC Shimadzu Prominence (Shimadzu Corp. Kyoto, Japón) equipado con una bomba LC-20AT, una unidad desgasificadora DGU-

20AS, un automuestreador SIL-20A HT, un detector de arreglo de diodos SPD-M20A y un horno CTO-20A. La separación se llevó a cabo en una columna Varian Polaris C18-Amida (200 x 4.6 mm 5 μ m). Se utilizó un método isocrático con una fase móvil compuesta por metanol (35% v/v), ácido acético (1.25% v/v) y agua (63.75% v/v) a un flujo de 1 mL/min durante 20 min.

Los AHCs fueron detectados a 320 nm, la cuantificación se realizó por el método del estándar externo. Se prepararon curvas de calibración para cada compuesto (ACL, AC, ApC y AF) en un rango de 0.025 a 0.5 mg/mL. Los resultados se expresaron como mg/g PC (bs). En la Figura 6.1 se muestran cromatogramas representativos de los estándares y las muestras analizadas.

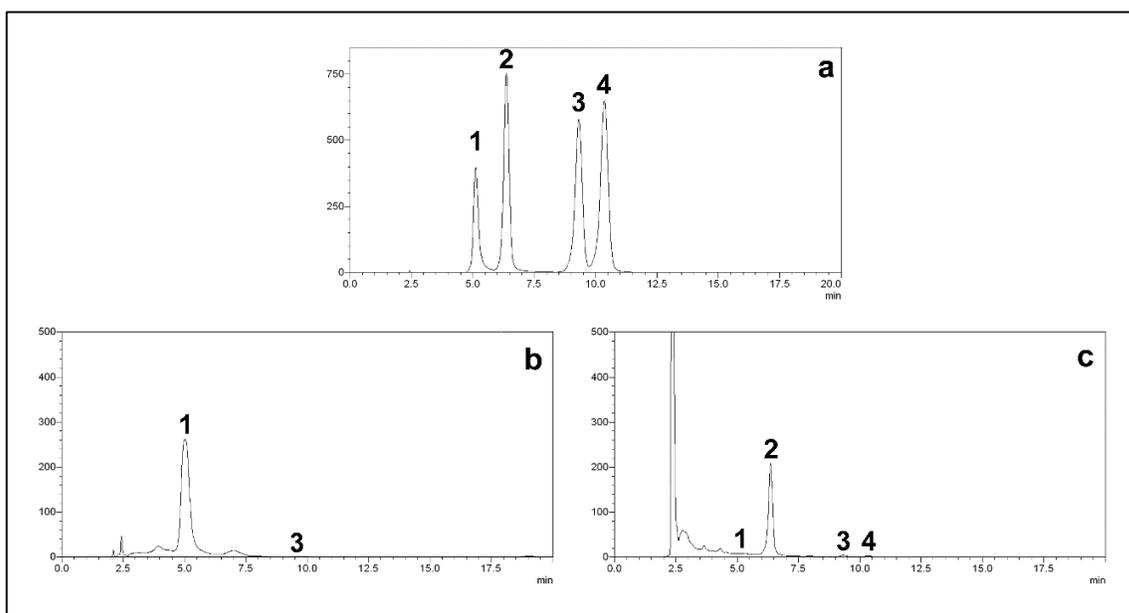


Figura 6.1 Cromatogramas representativos de una mezcla de estándares (a), un extracto metanólico (b) y un hidrolizado alcalino (c). 1 = ACL, 2 = AC, 3 = AF y 4 = ApC

6.3.5 Análisis estadístico

Todas las extracciones y análisis se realizaron al menos por triplicado. Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza de los datos y las medias se compararon usando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico JMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

6.4 Resultados y discusión

6.4.1 Caracterización física de los frutos de café

Los frutos recolectados se clasificaron por personal capacitado en la finca. Posteriormente se realizó una caracterización física de los frutos en el laboratorio. Se observaron diferencias morfológicas entre los frutos de la misma variedad, en diferente estado de madurez, así como entre frutos del mismo estado de madurez pero diferente variedad (Figura 6.2). Estas diferencias se confirmaron con la caracterización física.

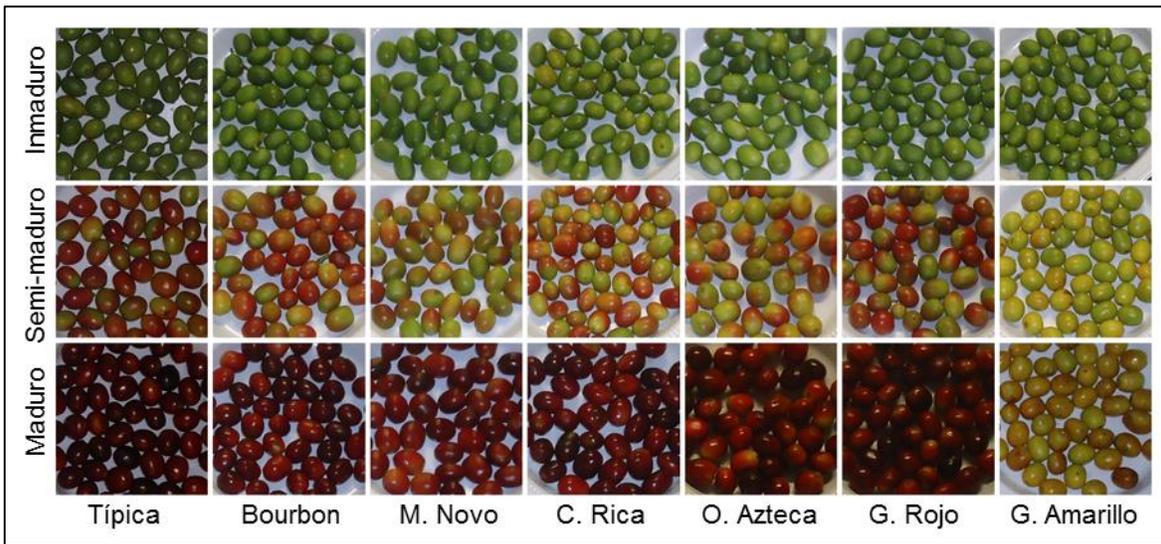


Figura 6.2 Frutos de café de siete variedades en tres estados de madurez.

Se confirmó un incremento progresivo en el tamaño y peso de los frutos durante la maduración (Figura 6.3). También se observaron diferencias significativas entre frutos de diferente variedad y el mismo estado de maduración. Los frutos más grandes y más pesados fueron las frutas maduras de la variedad Oro Azteca, seguido de los frutos de las variedades Mundo Novo y Costa Rica. Los frutos más pequeños corresponden a las cerezas de la variedad Bourbon. Varios autores han descrito los cambios en el tamaño y el peso de los frutos del café durante la maduración (Geromel *et al.*, 2004; Koshiro *et al.*, 2007; Carvajal-Herrera *et al.*, 2012). Las diferencias físicas (peso y volumen) entre los frutos de café de diferentes variedades son conocidas por los agricultores, pero no han sido descritas en la bibliografía.

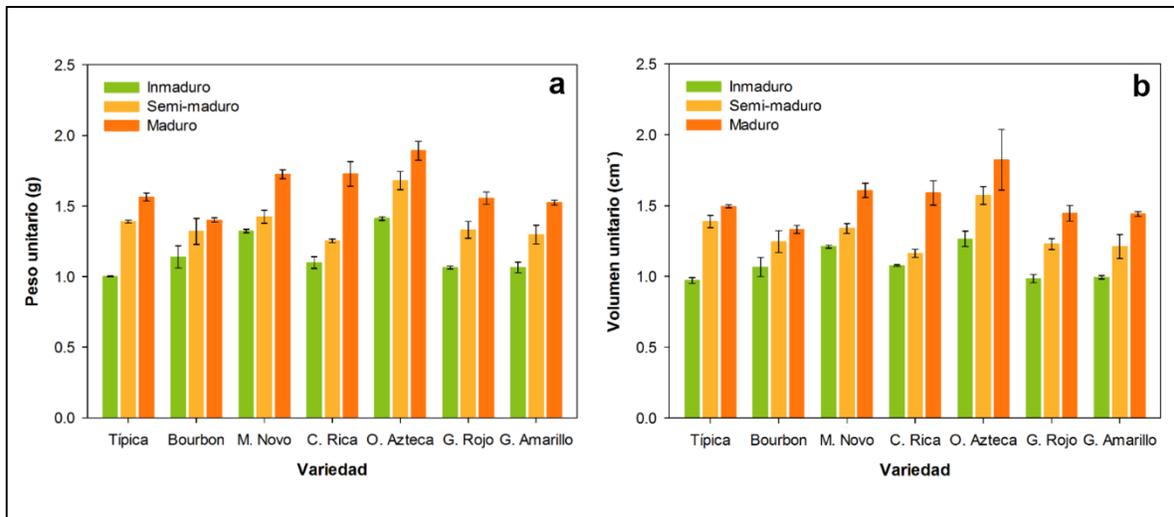


Figura 6.3 Peso (a) y volumen unitario (b) de los frutos de café analizados.

El color exterior de los frutos de café ha sido tradicionalmente considerado el principal criterio para determinar la madurez del fruto. Esta característica se usa para determinar el inicio de la cosecha (Marín-López *et al.*, 2003). Por ello, usamos la medición del color para establecer diferencias entre los estados de madurez de los frutos del café.

Se observó un incremento progresivo en el componente rojo (r) del color, así como una disminución del componente verde (g) para todas las muestras de café (Tabla 6.1). Por otra parte, el componente azul (b) fue el más pequeño en todos los casos. Por lo que sólo los parámetros rojo (r) y verde (g) fueron utilizados para evaluar el cambio del color en durante la maduración de los frutos de café.

Los valores de r se incrementaron de 0.335-0.387 en las frutas inmaduras a 0.552-0.736 para cerezas maduras. Los valores de g disminuyeron de 0.427-0.514 en las frutas inmaduras a 0.170-0.357 para las frutas maduras.

Otro parámetro que puede considerarse para analizar los cambios en el color durante la maduración es la relación entre los parámetros de cromaticidad r y g (relación r/g). Se obtuvieron valores de r/g menores a 1 para los frutos inmaduros. Los valores de la relación r/g para los frutos semi-maduros entre 1 y 2 (1.12-1.93) y para los frutos maduros los valores de r/g fueron mayores a 2 (2.30-4.06) excepto para la variedad Garnica Amarilla ($r/g = 1.60$).

Tabla 6.1 Cromaticidad de la superficie de los frutos de siete variedades en tres estados de madurez

Variedad	Estado de madurez	Cromaticidad roja (<i>r</i>)	Cromaticidad verde (<i>g</i>)	Cromaticidad azul (<i>b</i>)	Relación <i>r/g</i>
Típica	Inmaduro	0.38 ± 0.03 ⁱ	0.46 ± 0.01 ^{bc}	0.16 ± 0.03 ^{bcd}	0.83
	Semi-maduro	0.59 ± 0.05 ^{def}	0.31 ± 0.05 ^f	0.10 ± 0.02 ^{efg}	1.93
	Maduro	0.69 ± 0.06 ^{ab}	0.17 ± 0.02 ^h	0.14 ± 0.04 ^{cde}	4.05
Bourbon	Inmaduro	0.35 ± 0.01 ⁱ	0.51 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.02 ^{cde}	0.67
	Semi-maduro	0.54 ± 0.06 ^{fgh}	0.35 ± 0.06 ^{def}	0.11 ± 0.01 ^{efg}	1.57
	Maduro	0.65 ± 0.08 ^{bc}	0.19 ± 0.03 ^h	0.16 ± 0.05 ^{bcd}	3.52
Mundo	Inmaduro	0.33 ± 0.02 ⁱ	0.50 ± 0.01 ^{ab}	0.17 ± 0.03 ^{abc}	0.68
Novo	Semi-maduro	0.50 ± 0.03 ^{gh}	0.37 ± 0.03 ^d	0.13 ± 0.02 ^{de}	1.35
	Maduro	0.61 ± 0.05 ^{cde}	0.20 ± 0.02 ^{gh}	0.19 ± 0.03 ^{ab}	3.04
Costa Rica	Inmaduro	0.38 ± 0.01 ⁱ	0.48 ± 0.02 ^{ab}	0.13 ± 0.02 ^{cde}	0.79
	Semi-maduro	0.55 ± 0.03 ^{fgh}	0.34 ± 0.04 ^{def}	0.12 ± 0.02 ^{ef}	1.62
	Maduro	0.61 ± 0.04 ^{cd}	0.20 ± 0.01 ^{gh}	0.19 ± 0.03 ^{ab}	3.13
Oro	Inmaduro	0.36 ± 0.02 ⁱ	0.47 ± 0.01 ^{bc}	0.17 ± 0.02 ^{abcd}	0.78
Azteca	Semi-maduro	0.53 ± 0.04 ^{fgh}	0.37 ± 0.04 ^d	0.10 ± 0.02 ^{efg}	1.44
	Maduro	0.74 ± 0.04 ^{cd}	0.19 ± 0.02 ^{gh}	0.08 ± 0.02 ^{fg}	3.94
Garnica	Inmaduro	0.38 ± 0.01 ⁱ	0.43 ± 0.01 ^c	0.19 ± 0.02 ^{ab}	0.89
Rojo	Semi-maduro	0.49 ± 0.02 ^h	0.32 ± 0.02 ^{ef}	0.19 ± 0.01 ^{ab}	1.52
	Maduro	0.55 ± 0.02 ^{efg}	0.24 ± 0.01 ^g	0.21 ± 0.02 ^a	2.30
Garnica	Inmaduro	0.38 ± 0.02 ⁱ	0.50 ± 0.01 ^{ab}	0.12 ± 0.02 ^{ef}	0.77
Amarillo	Semi-maduro	0.49 ± 0.02 ^h	0.44 ± 0.01 ^c	0.07 ± 0.02 ^g	1.12
	Maduro	0.57 ± 0.03 ^{def}	0.36 ± 0.03 ^{de}	0.07 ± 0.02 ^g	1.60

*La misma letra en la misma columna significa que no hay diferencias significativas entre las muestras (prueba de Tukey, $\alpha=0.05$)

Varios autores han estudiado el cambio del color externo de los frutos del café durante la maduración usando técnicas espectrofotométricas (Carvajal-Herrera *et al.*, 2011; Aristizábal-Torres *et al.*, 2012) o de visión artificial (Sandoval-Niño y Prieto-Ortiz, 2007). Estas metodologías son confiables y reproducibles, pero requieren de equipo especializado que no siempre está disponible. Otros autores han utilizado la comparación con tablas de referencia para medir los cambios de color (Marín-López *et al.*, 2003; Cárdenas, 2007). Las tablas de colores son sencillas, pero la medición del color depende de la habilidad del juez. Además, es difícil comparar una tarjeta de un color uniforme con una superficie heterogénea (Hernández *et al.*, 2004). En todos los casos se observó un incremento en la cromaticidad roja y una disminución de la cromaticidad verde.

El exocarpio (piel) existe como un tejido verde durante la mayor parte del desarrollo del fruto. Pero en el estado maduro el exocarpio cambia su color a rojo (o amarillo, dependiendo de la variedad) como resultado de la disminución del contenido de clorofila y la acumulación de antocianinas (De Castro y Marraccini, 2006).

6.4.2 Extracción de AHCs solubles e insolubles

Los AHCs de la PC son compuestos fenólicos con importantes actividades biológicas. Por ello, se han realizado varios estudios sobre la extracción y análisis de los AHCs de la PC (Ramírez-Martínez, 1988; Clifford y Ramírez-Martínez, 1991a; Ramírez-Coronel *et al.*, 2004; Arellano-González *et al.*, 2011; Torres-Mancera *et al.*, 2011). La mayoría de estos trabajos se limitan a los compuestos extraíbles con soluciones de metanol acuoso (Ramírez-Martínez, 1988; Clifford y Ramírez-Martínez, 1991a; Ramírez-Coronel *et al.*, 2004). Sin embargo, existen cantidades significativas que permanecen en el residuo sólido después de las extracciones con solvente, como los AHCs ligados covalentemente a los polímeros de la pared celular (Pérez-Jiménez y Torres, 2011).

En estudios preliminares, encontramos diferencias importantes en el contenido de AHCs solubles e insolubles de la PC obtenidos por diferentes metodologías analíticas. Por ello, decidimos evaluar las condiciones de extracción utilizadas para el análisis de estos compuestos.

Como primer paso, se evaluó el efecto de la extracción con hexano seguida de la extracción con metanol acuoso sobre la recuperación de AHCs solubles de la PC. El rendimiento se calculó con base al ACL recuperado, ya que éste es el AHC más abundante en la fracción soluble de la PC (93.8-98.8%). La Figura 6.4a muestra el contenido de ACL extraído en cada lavado sucesivo con metanol acuoso con y sin pre-tratamiento con hexano. La cantidad de ACL extraído hasta el cuarto lavado con metanol se consideró el 100%, ya que a partir del quinto lavado no se detectó ACL.

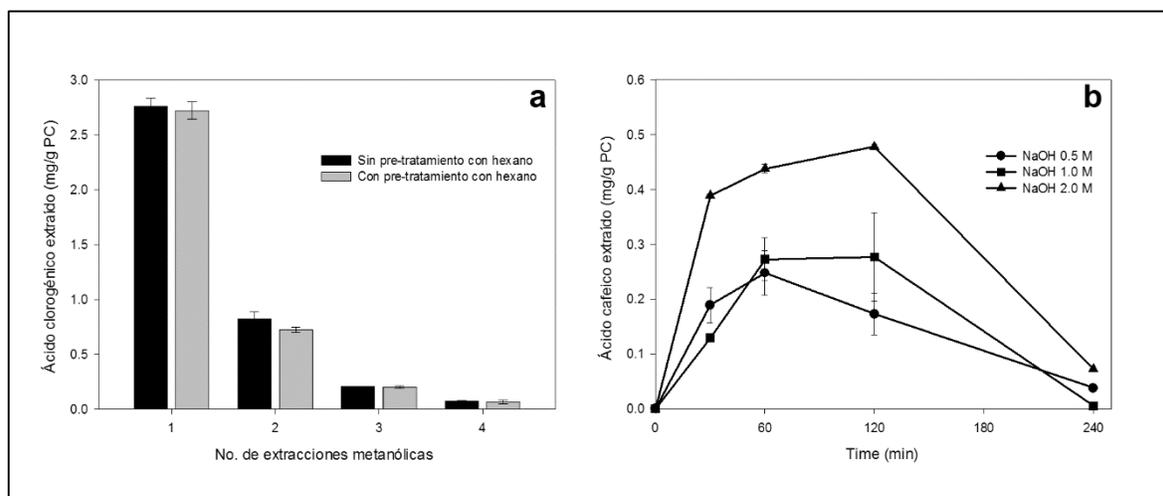


Figura 6.4 Extracción de ACL de la PC por extracciones sucesivas con metanol acidificado (a) y de AC de la PC por hidrólisis alcalina con diferentes concentraciones de NaOH (b)

No se encontraron diferencias entre los rendimientos obtenidos con y sin pre-tratamiento con hexano. El pretratamiento con hexano no afecta la extracción de los AHCs, sin embargo, puede promover la extracción de compuestos menos polares, como los carotenoides y otros compuestos lipofílicos que pueden interferir con el análisis cromatográfico de los extractos (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004). Por ello, para fines analíticos, decidimos hacer tres extracciones con hexano seguido de tres extracciones metanólicas. Con este protocolo se recuperó más del 98% del ACL soluble.

Varios autores han utilizado la hidrólisis alcalina para extraer la fracción insoluble de los AHCs. Sin embargo, las condiciones utilizadas para esta hidrólisis generalmente conducen a pérdidas importantes de ácidos fenólicos, particularmente de derivados dihidroxilados, como el AC (Nardini *et al.*, 2002). Krygier *et al.* (1982) reportaron pérdidas

del 66.7% del AC cuando trataron las muestras con NaOH 2M durante 4 h en una atmósfera de nitrógeno. Para evitar la pérdida de compuestos fenólicos Nardini *et al.* (2002) propusieron la adición de EDTA y ácido ascórbico durante la hidrólisis alcalina. En las condiciones utilizadas (NaOH 2M, EDTA 10 mM, ácido ascórbico 1% a 30 °C durante 30 min), el ACL se hidrolizó completamente a AC, sin pérdidas detectables de AC (Nardini *et al.*, 2002).

En estudios preliminares observamos pérdidas importantes de compuestos fenólicos durante la hidrólisis alcalina de la PC. Por ello decidimos estudiar las condiciones de la hidrólisis alcalina para la recuperación de AHCs de la PC. Se estudió el efecto de la concentración de NaOH (en presencia de EDTA y ácido ascórbico) y del tiempo de incubación sobre la recuperación de los AHCs.

La Figura 6.4b muestra la extracción de AC durante la hidrólisis alcalina de la PC con diferentes concentraciones de NaOH. Se observó un incremento en la cantidad de AC extraído durante los primeros minutos de la hidrólisis alcalina, seguido de una disminución de este compuesto. Esto se puede explicar por la existencia de al menos dos reacciones: primero, una reacción de hidrólisis que rompe los enlaces éster entre el AC y los polímeros de la pared celular. Después, una reacción en donde el AC es transformado en otro compuesto (no identificado), probablemente por oxidación. La mayor cantidad de AC se obtuvo usando NaOH 2M e incubando 2 h a 40 °C. Estas condiciones se utilizaron para la extracción analítica. Para evaluar la eficiencia de la hidrólisis alcalina, se utilizó ACL como estándar interno. Se agregó una concentración conocida de ACL a la PC libre de AHCs solubles (1 mg/g de PC), el material se sometió a las condiciones de hidrólisis alcalina y se analizó el contenido de AHCs. En las condiciones ensayadas, se recuperó el 90% del AC esperado como producto del ACL adicionado.

6.4.3 Contenido de AHCs de la PC de diferentes variedades

La información sobre el contenido y distribución de los compuestos fenólicos en la PC es confusa y en ocasiones contradictoria. La variedad y el grado de madurez del fruto pueden afectar el contenido de los compuestos fenólicos de la PC. La maduración de los frutos del café se caracteriza por una serie de cambios físicos y químicos, como el incremento de tamaño y peso, cambio en el color y en el contenido de azúcares y de compuestos fenólicos. La maduración también puede afectar el contenido de AHCs de la PC (Marín-

López *et al.*, 2003). Por ello, se analizó el contenido de AHCs solubles e insoluble en la PC, como función de la variedad y el grado de madurez de los frutos de café.

El contenido de AHCs depende en gran medida del estado de madurez y la variedad del fruto (Figura 6.5). El contenido de AHCs totales (definidos como la suma de ACL, AC, AF y ApC) se incrementó al pasar del estado inmaduro (2.0-10.7 mg/g PC) al estado semi-maduro (11.6-25.5 mg/g) en cinco de siete variedades, seguido de una disminución al pasar del estado semi-maduro al estado maduro (3.0-6.5 mg/g PC) en seis de siete variedades. En el caso de la variedad Típica, se observó una tendencia inversa. Estas observaciones difieren a las de Koshiro *et al.* (2007). Ellos estudiaron el contenido de ACL en la pulpa y semillas de las frutas de *C. arabica* y *C. canephora* en cinco diferentes estados de madurez. Ellos encontraron un incremento progresivo de ACL durante la maduración del fruto. Esto se debe a la síntesis continua de ACL, como lo sugiere la expresión de tres genes relacionados con la biosíntesis de ACL. Las diferencias encontradas pueden explicarse por la presentación de los resultados. Ellos expresaron el contenido de AHCs en mg/fruto. Cuando expresaron sus resultados como mg/g de pericarpio (bs), no se observó incremento de ACL durante la maduración de los frutos.

Por otra parte, Miljkovic *et al.* (2010) patentaron un proceso para la extracción de un producto nutracéutico a partir de frutos de café enteros. Ellos recomendaron el uso de frutos inmaduros o semi-maduros debido a que estos frutos tienen mayor contenido de compuestos fenólicos y ACL (6.7-8.6% de ACL) con respecto a los frutos maduros (1.3% de ACL). Estos resultados están de acuerdo con nuestras observaciones.

Puertas-Mejía *et al.* (2012) estudiaron la acumulación de los compuestos fenólicos en el pericarpio (pulpa) de frutos del café en cinco diferentes estados de madurez. Ellos encontraron un incremento progresivo de antocianinas durante la maduración (desde el estado inmaduro hasta el sobre-maduro). Sin embargo, los extractos obtenidos de los frutos semi-maduros presentaron la mayor actividad antioxidante. Ellos asociaron estas observaciones con la presencia de compuestos adicionales con actividad antioxidante. Esta actividad antioxidante podría deberse a la presencia de AHCs. Sin embargo, estos compuestos no fueron analizados en dicho trabajo (Puertas-Mejía *et al.*, 2012).

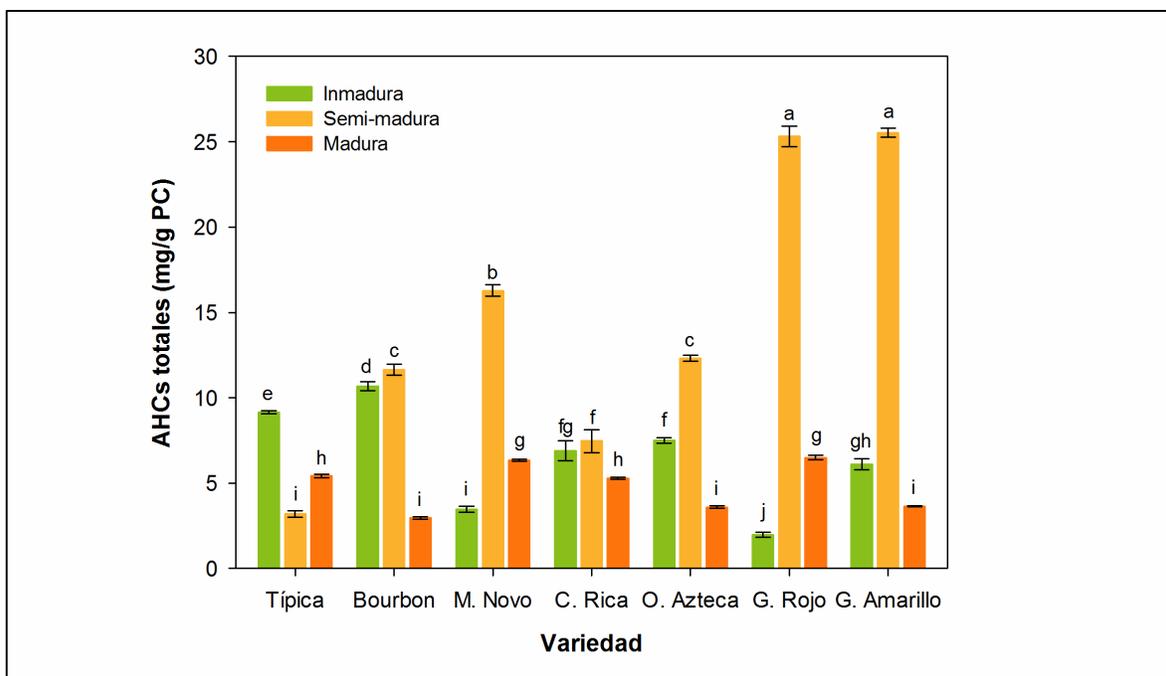


Figura 6.5 Contenido de AHCs totales (ACL, AC, AF y ApC) en la PC de frutos de siete variedades en tres estados de madurez.

El contenido de AHCs en la PC difiere significativamente entre variedades. Estas diferencias dependen también del estado de madurez. Para la pulpa de los frutos maduros las variedades Garnica Rojo y Mundo Novo presentaron el mayor contenido de AHCs totales (6.34-6.49 mg/g PC), seguido por la PC de las variedades Típica y Costa Rica (5.29-5.42 mg/g PC), la PC de las variedades Garnica Amarillo, Oro Azteca y Bourbon presentaron el menor contenido de AHCs (2.96-3.64 mg/g PC). Para las muestras de café semi-maduro la PC de las variedades Garnica Rojo y Garnica Amarillo tuvieron un contenido de AHCs notablemente alto (25.32-25.54 mg/g PC). Por otro lado, la variedad Típica presentó un bajo contenido de AHCs (3.20 mg/g PC). En cuanto a la PC de frutos inmaduros, las variedades Típica y Bourbon presentaron el mayor contenido de AHCs (9.18-10.69 mg/g PC), mientras que las variedades Garnica Rojo y Mundo Novo tienen el menor contenido de estos compuestos (1.99-3.49 mg/g PC).

Varios autores (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a) han estudiado el contenido de compuestos fenólicos de la PC de diferentes variedades, pero estos estudios se limitan a la fracción soluble en metanol, y se obtuvieron a partir de frutos maduros. Se ha encontrado un contenido de AHCs de 3.98 a 16.20 mg/g PC para diferentes

variedades de *C. arabica* y *C. canephora*. Algunos de esos valores son mayores a los encontrados en este trabajo para los frutos maduros (2.96-6.49 mg/g PC). Las diferencias encontradas en el contenido de AHCs pueden estar relacionadas al origen del material vegetal (suelo, clima, etc.) así como a las prácticas agrícolas.

Las tablas 6.2 y 6.3 muestran el contenido de AHCs solubles e insoluble para cada variedad y estado de madurez. El contenido de AHCs solubles es mayor que el de los AHCs insolubles, y representan del 81 al 97% de los AHCs totales, excepto para la variedad Garnica Rojo, en la cual representan el 68% de los AHCs totales. Estos resultados difieren de lo reportado por otros autores (Arellano-González *et al.*, 2011; Pérez-Morales *et al.*, 2011; Torres-Mancera *et al.*, 2011), quienes encontraron un mayor contenido de AHCs insolubles que los AHCs solubles.

Las diferencias en el contenido de AHCs solubles e insolubles en la PC pueden estar relacionadas al origen del material vegetal, pero también a las metodologías de extracción y análisis. En este trabajo demostramos que, en las condiciones utilizadas, son necesarias tres extracciones con metanol acuoso para recuperar el 98% del ACL soluble. Una extracción incompleta de los AHCs solubles puede conducir a la sub-estimación de la fracción soluble y la sobre-estimación de la fracción insoluble de los AHCs.

El principal componente de la fracción soluble de los AHCs fue el ACL (Tabla 6.2). El ACL representa del 94 al 99% de los AHCs solubles (1.31-24.42 mg/g PC). Estos valores son mayores a los reportados por otros autores (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Pérez-Morales *et al.*, 2011; Torres-Mancera *et al.*, 2011). Ellos encontraron que el ACL representa alrededor del 80-84% de los AHCs solubles. El contenido de ACL en la fracción soluble de la PC (2.2-5.8 mg/g PC) está dentro del rango encontrado por otros autores (Ramirez-Martinez, 1988; Clifford y Ramirez-Martinez, 1991a; Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Torres-Mancera *et al.*, 2011). Estos autores reportaron un contenido de 2.3 a 9.7 mg de ACL/g PC analizando extractos metanólicos de PC por HPLC. Otros compuestos identificados en los extractos metanólicos de PC fueron el AF y el ApC.

Tabla 6.2 Contenido de AHCs solubles en la PC de procedente de siete variedades de *C. arabica* en tres estados de madurez del estado de Veracruz

Variedad	Estado de madurez	ACL (mg/g PC)	AC (mg/g)	AF (mg/g)	ApC (mg/g)	AHCs solubles (mg/g)
Típica	Inmaduro	8.21 ± 0.07 ^e	nd	0.18 ± 0.02 ^{ef}	0.03 ± 0.00 ^{cdef}	8.43 ± 0.08 ^e
	Semi-maduro	2.56 ± 0.18 ^j	nd	0.06 ± 0.00 ^j	0.02 ± 0.00 ^{efg}	2.64 ± 0.19 ^k
	Maduro	4.59 ± 0.14 ⁱ	nd	0.16 ± 0.00 ^{fgh}	0.04 ± 0.00 ^{bc}	4.79 ± 0.13 ^j
Bourbon	Inmaduro	9.77 ± 0.25 ^d	nd	0.25 ± 0.00 ^{bc}	0.04 ± 0.00 ^{bcde}	10.05 ± 0.25 ^d
	Semi-maduro	10.84 ± 0.29 ^c	nd	0.22 ± 0.02 ^{cd}	0.05 ± 0.00 ^{abc}	11.10 ± 0.32 ^c
	Maduro	2.26 ± 0.08 ^j	nd	0.11 ± 0.00 ⁱ	0.03 ± 0.00 ^{bcde}	2.41 ± 0.09 ^k
Mundo	Inmaduro	2.80 ± 0.17 ^j	nd	0.02 ± 0.00 ^k	0.03 ± 0.01 ^{bcde}	2.85 ± 0.17 ^k
Novo	Semi-maduro	15.27 ± 0.36 ^b	nd	0.28 ± 0.01 ^{bc}	0.05 ± 0.01 ^{abc}	15.60 ± 0.37 ^b
	Maduro	5.56 ± 0.05 ^{gh}	nd	0.16 ± 0.00 ^{fgh}	0.04 ± 0.00 ^{bcd}	5.76 ± 0.05 ^{hi}
Costa	Inmaduro	6.08 ± 0.56 ^{fg}	nd	0.14 ± 0.01 ^{hi}	0.02 ± 0.00 ^{efg}	6.23 ± 0.56 ^{fgh}
Rica	Semi-maduro	6.70 ± 0.65 ^f	nd	0.16 ± 0.00 ^{fgh}	0.04 ± 0.03 ^{abc}	6.91 ± 0.68 ^f
	Maduro	4.56 ± 0.05 ⁱ	nd	0.17 ± 0.01 ^{fg}	0.05 ± 0.00 ^{abc}	4.78 ± 0.05 ^j
Oro	Inmaduro	6.62 ± 0.17 ^f	nd	0.17 ± 0.01 ^{fg}	0.02 ± 0.01 ^{efg}	6.81 ± 0.17 ^{fg}
Azteca	Semi-maduro	11.45 ± 0.18 ^c	nd	0.21 ± 0.00 ^{de}	0.03 ± 0.00 ^{cde}	11.69 ± 0.18 ^c
	Maduro	2.89 ± 0.09 ^j	nd	0.15 ± 0.01 ^{ghi}	0.04 ± 0.00 ^{bcde}	3.07 ± 0.09 ^k
Garnica	Inmaduro	1.31 ± 0.15 ^k	nd	0.04 ± 0.00 ^{jk}	0.01 ± 0.00 ^g	1.35 ± 0.15 ^l
Rojo	Semi-maduro	24.15 ± 0.62 ^a	nd	0.39 ± 0.00 ^a	0.06 ± 0.00 ^a	24.60 ± 0.63 ^a
	Maduro	5.84 ± 0.13 ^{fgh}	nd	0.04 ± 0.00 ^{jk}	0.04 ± 0.00 ^{abc}	5.93 ± 0.14 ^{ghi}
Garnica	Inmaduro	5.04 ± 0.36 ^{hi}	nd	0.05 ± 0.00 ^j	0.01 ± 0.00 ^{fg}	5.11 ± 0.37 ^{ij}
Amarillo	Semi-maduro	24.420 ± 0.256 ^a	nd	0.42 ± 0.03 ^a	0.05 ± 0.00 ^{ab}	24.89 ± 0.28 ^a
	Maduro	3.01 ± 0.03 ^j	nd	0.07 ± 0.00 ^j	0.02 ± 0.00 ^{defg}	3.10 ± 0.03 ^k

*La misma letra en la misma columna significa que no hay diferencia significativa entre las medias (prueba de Tukey $\alpha=0.05$); valores = 0.00 significan ≤ 0.005 ; nd = no detectado

Tabla 6.3 Contenido de AHCs insolubles en la PC de siete variedades de *C. arabica* en tres estados de madurez

Variedad	Estado de madurez	ACL (mg/g)	AC (mg/g)	AF (mg/g)	ApC (mg/g)	AHCs insolubles (mg/g)
Típica	Inmaduro	0.06 ± 0.00 ^c	0.64 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.00 ^{cdef}	0.03 ± 0.00 ^{cd}	0.75 ± 0.02 ^b
	Semi-maduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.45 ± 0.00 ^{fg}	0.04 ± 0.00 ^{cd}	0.02 ± 0.00 ^{fghijk}	0.56 ± 0.00 ^{ijk}
	Maduro	0.08 ± 0.00 ^a	0.47 ± 0.01 ^f	0.04 ± 0.01 ^b	0.03 ± 0.00 ^{cde}	0.62 ± 0.02 ^{efgh}
Bourbon	Inmaduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.54 ± 0.01 ^e	0.02 ± 0.00 ^{ijkl}	0.02 ± 0.00 ^{kl}	0.63 ± 0.01 ^{efg}
	Semi-maduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.42 ± 0.01 ^{fghi}	0.03 ± 0.00 ^{hijkl}	0.02 ± 0.00 ^{ghijk}	0.52 ± 0.00 ^{ijk}
	Maduro	0.08 ± 0.00 ^a	0.41 ± 0.01 ^{ghi}	0.04 ± 0.00 ^c	0.02 ± 0.00 ^{defghi}	0.55 ± 0.01 ^{jk}
Mundo	Inmaduro	0.04 ± 0.00 ^d	0.54 ± 0.01 ^e	0.03 ± 0.00 ^{defghi}	0.02 ± 0.00 ^{defgh}	0.64 ± 0.01 ^{efg}
Novo	Semi-maduro	0.05 ± 0.01 ^{cd}	0.58 ± 0.02 ^{cde}	0.03 ± 0.00 ^{ijkl}	0.02 ± 0.00 ^{hijk}	0.67 ± 0.03 ^{cdef}
	Maduro	0.07 ± 0.00 ^b	0.44 ± 0.01 ^{fg}	0.04 ± 0.00 ^{cd}	0.03 ± 0.00 ^{cde}	0.58 ± 0.01 ^{ghij}
Costa	Inmaduro	0.06 ± 0.00 ^c	0.56 ± 0.02 ^{de}	0.03 ± 0.00 ^{cde}	0.03 ± 0.00 ^{ab}	0.69 ± 0.02 ^{cde}
Rica	Semi-maduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.44 ± 0.01 ^{fg}	0.03 ± 0.00 ^{ghijk}	0.02 ± 0.00 ^{defg}	0.54 ± 0.01 ^{jk}
	Maduro	0.08 ± 0.00 ^a	0.37 ± 0.04 ⁱ	0.04 ± 0.00 ^{cd}	0.02 ± 0.00 ^{cdef}	0.51 ± 0.04 ^k
Oro	Inmaduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.61 ± 0.00 ^{bcd}	0.03 ± 0.00 ^{fghij}	0.02 ± 0.00 ^{defgh}	0.71 ± 0.00 ^{bcd}
Azteca	Semi-maduro	0.04 ± 0.00 ^d	0.53 ± 0.01 ^e	0.02 ± 0.00 ^{kl}	0.02 ± 0.00 ^{ijk}	0.62 ± 0.01 ^{fghi}
	Maduro	0.08 ± 0.00 ^a	0.38 ± 0.01 ^{hi}	0.03 ± 0.00 ^{cdefg}	0.02 ± 0.00 ^{efghijk}	0.52 ± 0.01 ^{jk}
Garnica	Inmaduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.53 ± 0.01 ^e	0.03 ± 0.00 ^{cdefgh}	0.03 ± 0.00 ^{bc}	0.65 ± 0.02 ^{def}
Rojo	Semi-maduro	0.04 ± 0.00 ^d	0.63 ± 0.02 ^{bc}	0.02 ± 0.00 ^{ijkl}	0.02 ± 0.00 ^{ijkl}	0.72 ± 0.03 ^{bc}
	Maduro	0.06 ± 0.00 ^c	0.45 ± 0.00 ^{fg}	0.03 ± 0.00 ^{defghi}	0.02 ± 0.00 ^{efghij}	0.56 ± 0.00 ^{hijk}
Garnica	Inmaduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.91 ± 0.05 ^a	0.05 ± 0.00 ^a	0.04 ± 0.00 ^a	1.05 ± 0.05 ^a
Amarillo	Semi-maduro	0.04 ± 0.00 ^d	0.57 ± 0.01 ^{de}	0.02 ± 0.00 ^l	0.02 ± 0.00 ^l	0.65 ± 0.02 ^{def}
	Maduro	0.05 ± 0.00 ^{cd}	0.44 ± 0.02 ^{fgh}	0.03 ± 0.00 ^{efghij}	0.02 ± 0.00 ^{ghijk}	0.54 ± 0.02 ^{jk}

*La misma letra en la misma columna significa que no hay diferencia significativa entre las medias (prueba de Tukey $\alpha=0.05$); valores = 0.00 significan ≤ 0.005 ; n.d. = no detectado

El principal componente de los hidrolizados alcalinos de PC fue el AC, el cual representó el 72-88% de los AHCs insolubles (Tabla 6.3). El AC es el AHC más abundante en frutas y generalmente se encuentra esterificado a azúcares, ácidos orgánicos o lípidos (Scalbert y Williamson, 2000).

El ACL es el éster soluble de AC más abundante en la PC. Se encontraron pequeñas cantidades en los hidrolizados alcalinos, probablemente debido a la hidrólisis incompleta de la PC. El AF y el ApC se encontraron en el rango de 0.016 a 0.052 mg/g PC. Estos valores son menores a los reportados por Torres-Mancera *et al.* (2011) y Pérez-Morales *et al.* (2011). Ellos encontraron un contenido de 0.083-0.108 mg de AF por g de PC y 0.079-0.094 mg ApC por g de PC en la fracción insoluble. Estas diferencias pueden deberse al origen de la muestra (variedad, método de despulpado, método de secado, etc.), pero también a las técnicas analíticas utilizadas.

Finamente se analizó el contenido de AHCs solubles e insolubles en una muestra de PC obtenida de un proceso comercial (Tabla 6.4). Esta muestra se obtuvo mediante un beneficio húmedo tradicional y se usaron frutos maduros de la variedad Típica, principalmente. El contenido de AHC totales (4.67 mg/g PC) se encontró dentro del rango de los obtenidos para los frutos maduros de las diferentes variedades (2.96-6.49 mg/g PC). Al igual que en las muestras de las diferentes variedades, los AHCs de la PC comercial se encontraron principalmente en la fracción soluble (89.7%). El AHC más abundante en la fracción soluble fue el ACL (4.17 mg/g), y representó el 98.4% de los AHCs solubles de la PC. En la fracción insoluble, el AC fue el compuesto más abundante (0.376 mg/g PC) y representó el 78.4% de los AHCs de esta fracción.

Tabla 6.4 Contenido de AHCs solubles e insolubles en la PC obtenida de un proceso comercial

Compuesto	Fracción soluble (mg/g)	Fracción insoluble (mg/g)	Totales (mg/g)
Ac. Clorogénico	4.173 ± 0.017	0.067 ± 0.008	4.240 ± 0.022
Ac. Cafeico	0.000 ± 0.000	0.376 ± 0.030	0.376 ± 0.030
Ac. <i>p</i> -Cumárico	0.017 ± 0.000	0.014 ± 0.001	0.031 ± 0.001
Ac. Ferúlico	0.000 ± 0.000	0.023 ± 0.002	0.023 ± 0.002

El mayor contenido de ACL y AHCs encontró en los frutos semi-maduros de las variedades Garnica Rojo y Garnica Amarillo. Sin embargo, el cultivo de estas variedades es muy pequeño en la región de Veracruz. De acuerdo con las prácticas agrícolas de la región, solo se cosechan los frutos maduros para su procesamiento. Los frutos que no alcanzan su madurez al final de la cosecha permanecen en los árboles, y se desaprovechan. Estos frutos inmaduros son una fuente potencial de AHCs. Sin embargo, para su obtención se requiere de una cosecha adicional.

6.5 Conclusiones

La información disponible sobre el contenido y distribución de los compuestos fenólicos en la PC es confusa y en ocasiones puede ser contradictoria. En este trabajo se mejoró y definió una metodología para la extracción y cuantificación de las fracciones solubles e insolubles de los AHCs. Esta metodología se utilizó para estudiar el contenido de AHCs de la PC proveniente de frutos de siete variedades de café en tres estados de madurez.

Los AHCs de la PC se encuentran principalmente de la fracción soluble (81-97%) en todas las variedades y estados de madurez analizados. El ACL es el principal AHC en la fracción soluble (1.31-24.42 mg/g PC) y representa del 94 al 99% de los AHCs en esta fracción, mientras que el AC es el AHC más abundante en la fracción insoluble (0.37-0.91 mg/g PC) y representa del 72 al 85% de los AHCs insolubles de la PC.

El contenido de AHCs en la CP depende de la variedad y el grado de madurez del fruto del que proviene. El contenido de AHCs totales en la CP se incrementa durante la maduración del fruto (de inmaduro a semi-maduro) y disminuye en la última fase de la maduración (de semi-maduro a maduro) para para todos los casos estudiados, excepto para la variedad Típica. El mayor contenido de AHCs y ACL lo encontramos en los frutos semi-maduros de las variedades Garnica. Sin embargo, la disponibilidad de estas variedades es limitada. Por ello seleccionamos la PC obtenida de un beneficio comercial para la extracción, purificación y biotransformación del ACL. Por otra parte, sugerimos el uso de los frutos que no alcanzan la madurez comercial al final de la cosecha, como una potencial fuente económica de AHCs y otros compuestos bioactivos.

7. Extracción y purificación del ACL de la PC

7.1 Resumen

La PC es una potencial fuente económica de ACL y AHCs en general. La producción de AHCs a partir de la PC requiere de métodos eficientes para la extracción y recuperación de estos compuestos. En este capítulo se diseñó y aplicó una estrategia para extraer y purificar el ACL de la PC.

En esta sección se describe la extracción enzimática de AHCs de la PC utilizando carbohidrasas comerciales (pectinasas, xilanasas y celulasas). Se observó que el pretratamiento térmico (10 min, 10 psi en autoclave) permitió extraer 72.6% del ACL total de la PC. La adición de enzimas comerciales no incrementó el ACL extraído, incluso se observó una hidrólisis parcial del ACL. Cuando se utilizó una pectinasa comercial de *A. niger*, se observó una hidrólisis del 86.3% del ACL extraído. Esto probablemente se deba a la presencia de una actividad feruloil esterasa o clorogenato hidrolasa en la preparación comercial.

Alternativamente, se estudió la extracción asistida por microondas (EAM) para la extracción de ACL de la PC. Se evaluó el efecto del solvente, la concentración del solvente, la temperatura y el tiempo de extracción sobre la recuperación del ACL de la PC. En las mejores condiciones (etanol al 50%, 60 °C, 4 min) se recuperó el 67.5% del ACL total de la PC en un proceso rápido y sencillo. El rendimiento obtenido con la EAM (67.5%) fue ligeramente menor al obtenido por el tratamiento térmico en autoclave (72.5%). Sin embargo, la EAM fue más rápida y más fácil de controlar que el tratamiento térmico en autoclave. Por ello, se utilizó la EAM para la extracción preparativa de ACL.

El extracto etanólico de PC obtenido por EAM se purificó parcialmente mediante cromatografía en columna. El extracto se fraccionó primero en una columna empacada con la resina no polar Amberlita XAD-16 y después en una columna C18 semi-preparativa. Con esta metodología se obtuvo un extracto rico en ACL con una pureza del 61.7%. La metodología desarrollada permitió la extracción y purificación de ACL a partir de PC mediante un proceso rápido, sencillo y reproducible. La cantidad y pureza del ACL obtenido fueron suficientes para los estudios posteriores.

7.2 Introducción

Una de las aplicaciones potenciales más atractivas de la PC consiste en la producción de compuestos bioactivos, como los AHCs y el ACL. El ACL es el ácido fenólico más abundante en la PC, presenta importantes actividades biológicas y tiene aplicaciones industriales potenciales (Marques y Farah, 2009). Para llevar a la práctica estas aplicaciones se requiere de procesos eficientes de extracción, recuperación y purificación.

Varios autores han reportado la extracción de AHCs de la PC usando extracciones convencionales sólido-líquido con solventes orgánicos (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004; Pérez-Morales *et al.*, 2011) o por hidrólisis alcalina o enzimática (Arellano-González *et al.*, 2011; Torres-Mancera *et al.*, 2011). Los métodos de extracción acelerada, como la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU) se han utilizado exitosamente para la extracción de ACL de diferentes matrices, como los botones de *Lonicera japonica*, los granos de café verde, las hojas de *Eucommia ulmoides* y de tabaco (Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008a; Mazvimba *et al.*, 2012; Upadhyay *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguna de estas metodologías ha sido utilizada para la extracción de AHCs o ACL de la PC.

Para cualquiera de las aplicaciones potenciales de los AHCs se requiere de cierta concentración y pureza. Hasta el momento, no existen reportes sobre la purificación de AHCs extraídos de la PC. Pero existen reportes de la purificación de ACL y AF extraídos de otras fuentes.

Los procedimientos tradicionales para el aislamiento y purificación de AHCs incluyen extracciones líquido-líquido y cristalizaciones (Hulme, 1953; Rakotomalala, 1992). Sin embargo, estos procedimientos son largos, laboriosos y consumen grandes cantidades de solventes orgánicos. Otros autores han propuestos métodos más rápidos y convenientes para la purificación de ACL, como la adsorción en resinas macroporosas (Zhang *et al.*, 2008b; Sun *et al.*, 2013) y la cromatografía contracorriente de alta velocidad, HSCCC (Lu *et al.*, 2004).

En esta sección se estudió la extracción enzimática y la EAM para la recuperación de los AHCs de la PC. Los extractos obtenidos fueron utilizados para la purificación de ACL

mediante la adsorción en la resina no polar Amberlita XAD-16 seguida de cromatografía HPLC semi-preparativa usando una columna C18.

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Materiales

En este capítulo se utilizó un lote de PC obtenido de un beneficio comercial ubicado en el ejido San Marcos de León, en el municipio de Xico, Veracruz. Este lote se obtuvo mediante un beneficio húmedo convencional y se secó al sol durante 72 h y por 24 h más en un secador de charolas, para asegurar un contenido de humedad inferior al 10%. Para las extracciones, la PC seca se molió en un molino de cuchillas y se tamizó para obtener un polvo con un tamaño de partícula de 0.15 a 0.84 mm.

La PC libre de AHCs solubles se obtuvo mediante 3 extracciones metanólicas sucesivas. Se pesaron 2 g (bs) de PC en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Se agregaron 20 mL de metanol acuoso (metanol al 80% + 1% de ácido acético) y se incubó durante 35 min a 55 °C con agitación rotatoria (150 rpm). La mezcla se filtró a través de papel Whatman No. 1, esta extracción se repitió 2 veces más. El residuo sólido se secó durante 2 h a 55 °C.

Las enzimas utilizadas se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Se usaron las siguientes enzimas: pectinasa de *A. niger* (No. Cat. 17389) xilanasa de *Trichoderma longibrachiatum* (No. Cat. X2629) y celulasa de *Trichoderma longibrachiatum* (No. Cat. C9748).

7.3.2 Extracción enzimática de los AHCs de la PC

La PC seca y la PC libre de AHCs solubles se sometieron a un tratamiento térmico y enzimático con la finalidad de extraer los AHCs. Este tratamiento está basado en un método propuesto anteriormente (Torres-Mancera, 2013) con algunas modificaciones.

Se pesaron 2 g de PC seca. En el caso de las extracciones enzimáticas de la PC libre de AHCs solubles se utilizó el residuo 2 g de PC después de las 3 extracciones metanólicas, como se describió en la sección 7.3.1. Se agregaron 10 mL de agua destilada, se sometió a un tratamiento térmico en autoclave (10 min a 10 lb) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 5 mL de agua destilada estéril y 5 mL buffer citratos (100 mM,

pH 5) con 40 U/mL de pectinasa y xilanasa comerciales (concentración final 100 U/g de PC) y 80 mg/L de ciprofloxacino (concentración final = 100 mg/L) para evitar el crecimiento bacteriano. La mezcla se incubó durante 8 h a 40 °C con agitación constante (150 rpm). Después, los matraces se colocaron durante 4 h a -18 °C para detener la reacción. La mezcla se filtró y el líquido se analizó por HPLC. En un segundo experimento, se evaluó el efecto separado de tres enzimas comerciales (pectinasa, celulasa y xilanasa) sobre la extracción de AHCs después del tratamiento térmico.

7.3.3 Extracción asistida por microondas de ACL de la PC

Se evaluó la EAM para acelerar la extracción de los AHCs de la PC. Se colocó 1 g (bs) de PC en cada tubo de PTFE, se agregaron 10 mL de solvente y se agitó en vortex. Los tubos se colocaron en el horno de microondas MARS Express (CEM, USA) y se sometieron a una extracción a temperatura constante usando una potencia variable de 0 a 800 W durante la extracción. Una vez transcurrido el tiempo programado, se retiraron los tubos del horno de microondas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se separó el líquido de los sólidos por filtración. Los extractos obtenidos se llevaron a un volumen de 10 mL con el solvente de extracción, se filtraron a través de una membrana de celulosa regenerada de 22 µm y se analizaron por HPLC.

Se evaluó el efecto del solvente (agua, metanol 50% v/v y etanol 50% v/v), la concentración del solvente (etanol 0-100%), la temperatura (40-80 °C) y el tiempo de extracción (1-8 min) sobre la extracción de ACL de la PC. Finalmente, las condiciones seleccionadas se utilizaron para extraer los AHCs de 32 g de PC. Este extracto se utilizó para la purificación del ACL de la PC.

7.3.4 Purificación del ACL de la PC

Se purificó parcialmente el ACL a partir de un extracto etanólico de PC obtenido por EAM. Para ello, se utilizó una cromatografía de adsorción en la resina no iónica Amberlita XAD-16 seguida de una cromatografía líquida en fase reversa usando una columna C18 semi-preparativa en un equipo HPLC equipado con un detector de arreglo de diodos y un colector de fracciones. Se realizaron varias pruebas preliminares para seleccionar el relleno

cromatográfico utilizado en la primera cromatografía, así como el régimen de elución (isocrático o gradientes escalonados).

En el protocolo final, el extracto etanólico se concentró en rotovapor hasta eliminar el solvente orgánico, el extracto concentrado se secó en estufa a 60 °C durante 12 h hasta obtener un sólido seco. El extracto seco (8.791 g) se disolvió en agua desionizada (100 mL) y se aplicó a una columna empacada con Amberlita XAD-16 (250 mL) previamente equilibrada con agua. La columna se lavó con 4 volúmenes de agua desionizada (1000 mL) a un flujo de 15 mL/min (aproximadamente), este lavado se descartó. La muestra se eluyó con 4 volúmenes de etanol al 96% (v/v) a un flujo de 15 mL/min (aproximadamente). Se desecharon los primeros 125 mL (este volumen corresponde al volumen muerto de la columna), se recuperó el primer volumen de columna (250 mL) y los siguientes 625 mL se desecharon. La amberlita se equilibró con agua desionizada (1000 mL) antes de volver a usarla. La fracción rica en ACL (250 mL) se evaporó en rotavapor hasta la mitad de su volumen inicial (125 mL). El extracto concentrado se secó en estufa durante 12 h a 60 °C hasta obtener un sólido seco (1.656 g).

El extracto rico en ACL (1.656 g) se disolvió en 20 mL de una solución compuesta por metanol (25% v/v), ácido acético (0.9% v/v) y agua (74.1% v/v). La solución se filtró a través de membranas de celulosa regenerada de 0.22 µm y se inyectó en una columna C18 semi-preparativa (Restek Ultra C18 250 x 21.2 mm 5 µm). La separación se llevó a cabo en un equipo HPLC Shimadzu Prominence descrito anteriormente (sección 6.3.4). Se equilibró la columna con 75% de fase A (ácido acético 1.2% v/v) y 25% de fase B (metanol) a un flujo de 5 mL/min. Se inyectaron 10 mL de extracto y se eluyó de acuerdo al siguiente programa: 25% de B durante 60 min, un gradiente lineal de 25 a 100% de B en 10 min, 100% de B durante 10 min y un gradiente lineal de 100% a 25% de B en 10 min, la columna se equilibró durante 25 min antes de volver a usarla. Se colectaron fracciones de 5 mL, las fracciones con mayor contenido de ACL (34-39) se juntaron y se concentraron en rotovapor hasta eliminar el solvente, el extracto concentrado se secó en estufa a 60 °C durante 12 h.

7.3.5 Métodos analíticos

El análisis de AHCs se realizó en un sistema HPLC Shimadzu Prominence descrito anteriormente. La separación se llevó a cabo en una columna Restek Ultra C18 (150 x 3.2 mm, 5 μ m). Se utilizó un método isocrático con una fase móvil compuesta por metanol (25% v/v), ácido acético (0.9% v/v) y agua (74.1% v/v) a un flujo de 0.5 mL/min durante 20 min. Los AHCs fueron detectados a 320 nm, la cuantificación se realizó por el método del estándar externo. Se prepararon curvas de calibración para cada compuesto (ACL, AC, ApC y AF) en un rango de 0.002 a 0.5 mg/mL.

7.3.6 Análisis estadístico

Todas las extracciones y análisis se realizaron al menos por triplicado. Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza de los datos y las medias se compararon usando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). El análisis estadístico se realizó usando el software Sigmaplot 12.0 (Systat Software, Inc. San Jose, CA, USA).

7.4 Resultados y discusión

7.4.1 Extracción enzimática de los AHCs de la PC

Para evaluar el potencial de la hidrólisis enzimática para extraer los AHCs de la PC, se realizó una hidrólisis usando una combinación de enzimas comerciales (pectinasa y xilanasa) en las condiciones antes descritas (Torres-Mancera, 2013). Se sometió la PC seca y a la PC libre de AHCs solubles a una hidrólisis enzimática en condiciones similares. Además, se comparó la cantidad de AHCs extraídos con y sin tratamiento térmico.

En la Figura 7.1 se muestra la cantidad de ACL y AC extraído por cada uno de los tratamientos utilizados. Se puede observar que cuando la PC libre de AHCs solubles es sometida al tratamiento enzimático, solo se logran extraer pequeñas cantidades de ACL (0.017-0.018 mg/g PC) y AC (0.055-0.100 mg/g PC). Estas cantidades son de alrededor del 25-27% del ACL y 15-27% del AC presente en la fracción insoluble de la PC (Tabla 6.4). Por lo que el tratamiento enzimático propuesto no es eficiente para extraer los AHCs esterificados de la PC.

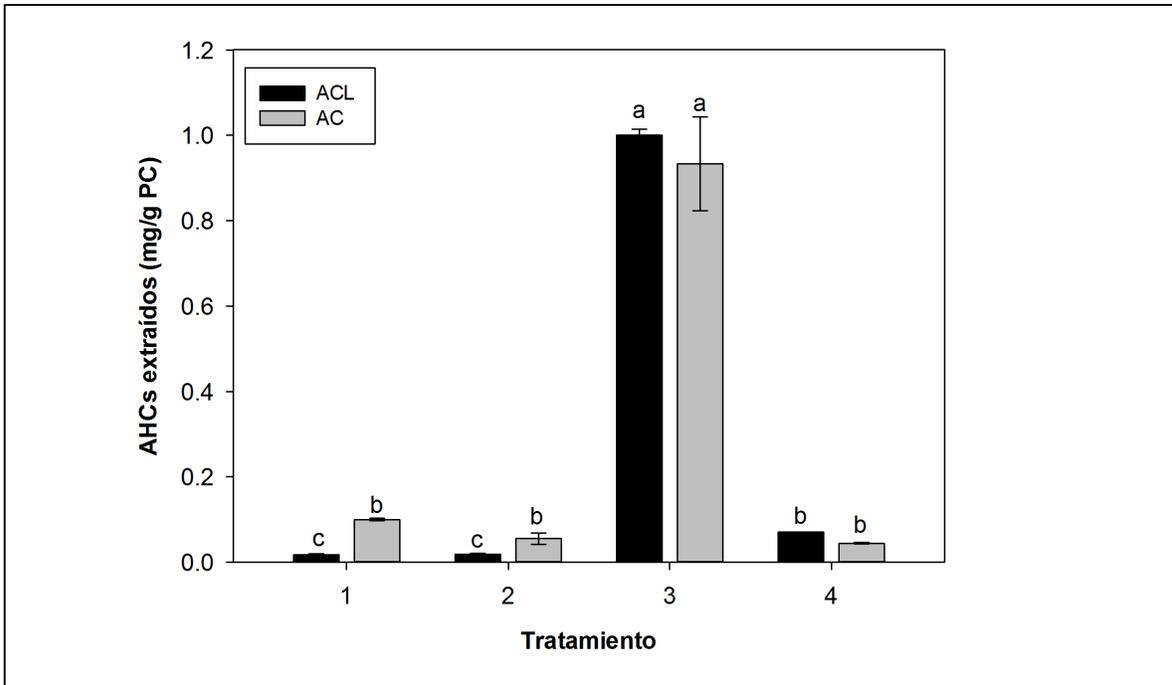


Figura 7.1 Extracción de AHCs por hidrólisis enzimática (1 = PC libre de AHCs solubles + Tratamiento Térmico + Tratamiento Enzimático; 2 = PC libre de AHCs solubles + Tratamiento Enzimático; 3 = PC Entera + Tratamiento Térmico + Tratamiento Enzimático; 4 = PC entera + Tratamiento Enzimático).

Por otro lado, cuando la PC entera fue sometida a un tratamiento térmico, seguido de un tratamiento enzimático con una pectinasa y una xilanasa comercial, se observó una extracción de ACL correspondiente al 23.6% del ACL total determinado por el método analítico, y una cantidad de AC 2.5 veces mayor a la del AC presente en la PC. Esto sugiere una hidrólisis parcial del ACL durante el tratamiento térmico y/o enzimático. Cuando la PC entera se sometió al tratamiento enzimático sin un tratamiento térmico previo, sólo se extrajeron pequeñas cantidades de ACL y AC (0.070 y 0.044 mg/g PC, respectivamente).

Para comprender esta situación relacionada con la hidrólisis del ACL se planteó un segundo experimento, en donde la PC entera se sometió a un tratamiento térmico seguido de un tratamiento enzimático usando 3 enzimas (pectinasa, xilanasa y celulasa) en tratamientos independientes. Además, se preparó un tratamiento control en donde no se utilizaron enzimas.

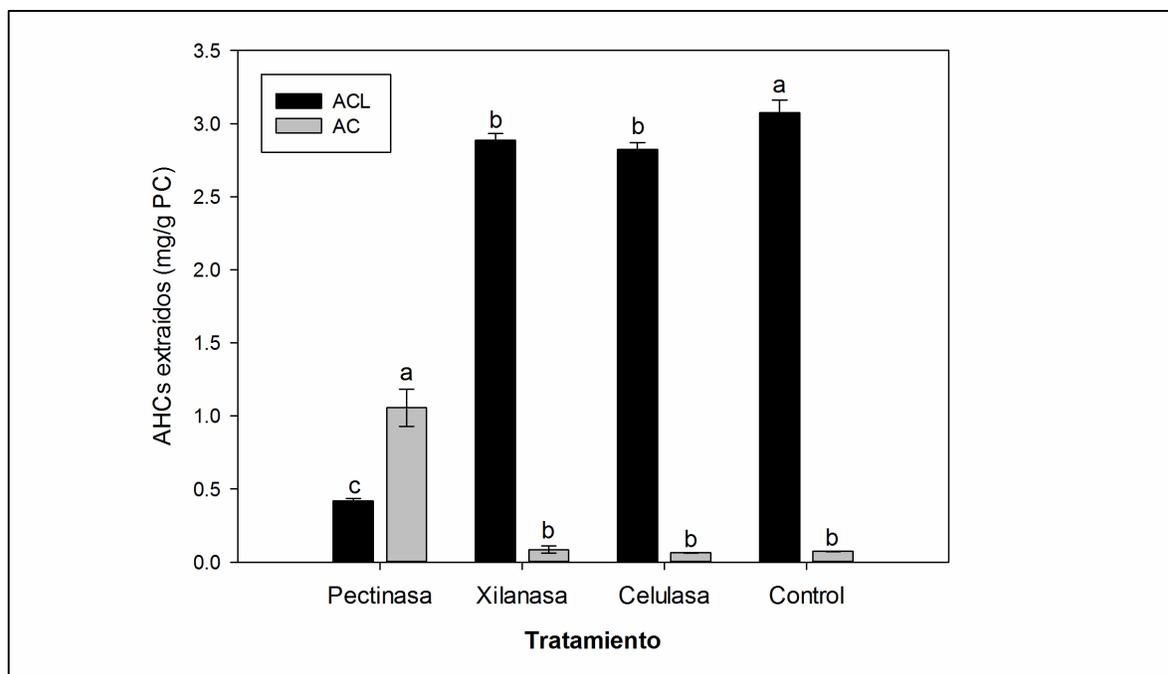


Figura 7.2 Extracción de AHCs por hidrólisis con enzimas comerciales independientes.

En la Figura 7.2 se muestra la cantidad de ACL y AC extraído con las diferentes enzimas. Se puede observar que, en el control sin enzima se extrajo la mayor cantidad de ACL de la PC. En este tratamiento se extrajo el 72.6% del ACL total presente en la PC. En los tratamientos con xilanasa y celulasa se recuperó el 66-68% del ACL total. Esto es ligeramente menor a la cantidad de ACL extraída en el tratamiento control. En el caso del tratamiento con pectinasa se observó una disminución del 86.3% de ACL extraído en el tratamiento control. Además, se observó un incremento en la cantidad de AC presente en el extracto. Este incremento en la cantidad de AC probablemente se debe a la hidrólisis parcial del ACL catalizada por la pectinasa. El incremento en la cantidad de AC corresponde a un 72.6% de la disminución del ACL con respecto al tratamiento control. En las condiciones de reacción enzimática, la pectinasa utilizada hidroliza el 83.6% del ACL presente, con un rendimiento molar de AC del 72.6%.

Estos resultados indican que la pectinasa comercial es la responsable de la hidrólisis parcial del ACL extraído por el tratamiento térmico. Esto sugiere la presencia de actividad clorogenato hidrolasa en la enzima comercial. La presencia de actividad clorogenato hidrolasa en preparaciones comerciales de pectinasa ha sido reportada previamente. Schobel

y Pollmann (1980) aislaron y caracterizaron una clorogenato esterasa a partir de una preparación comercial de pectinasa producida por *A. niger*. Faulds y Williamson (1993) purificaron y caracterizaron dos FAEs (FAE I y FAE II) a partir de una preparación comercial de pectinasa de *A. niger*. La FAE I fue capaz de hidrolizar el metil éster del AC. Barbe y Dubourdiou (1998) purificaron y caracterizaron una cinamoil esterasa capaz de hidrolizar el ACL a partir de una pectinasa comercial producida por *A. niger*. La presencia de actividad clorogenato hidrolasa en la pectinasa utilizada se confirmó en el capítulo 9.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren a los reportados por Torres-Mancera (2013) sobre la extracción enzimática de AHC mediante hidrólisis enzimática usando enzimas comerciales (pectinasa, xilanasas y celulasa). El mayor rendimiento de extracción de ACL lo obtuvo con la mezcla de pectinasa y xilanasas (100 U/g de PC de cada enzima). En estas condiciones, se extrajo el 68% del ACL total. Este rendimiento fue similar al obtenido usando una mezcla de tres extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. con la pectinasa comercial (10 U/g PC) (Torres-Mancera *et al.*, 2013). En ambos trabajos no se observó hidrólisis del ACL ni incremento en la cantidad de AC presente antes de la hidrólisis.

Por otra parte, Benoit *et al.* (2006) usaron una feruloil esterasa tipo B (FAE-B) para extraer los AHCs de la PC. Con este tratamiento se recuperó de manera cuantitativa el AC, el 73% del ApC y el 45% del AF extraíble por hidrólisis alcalina de la PC. En ese estudio no se encontró ACL después del tratamiento enzimático de la PC, ya que fue completamente hidrolizado por la enzima. Resultados similares fueron obtenidos cuando la PC autoclavada fue tratada con una clorogenato hidrolasa producida por *A. niger* (Asther *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en esta sección, sugieren que el tratamiento térmico propuesto puede ser utilizado para la extracción de ACL a partir de PC sin necesidad de un tratamiento enzimático adicional. Por otro lado, el tratamiento con pectinasa puede usarse para la recuperación de los productos de la hidrólisis del ACL (AC y AQ).

7.4.2 Extracción asistida por microondas de ACL de la PC

La EAM es una técnica que combina la extracción sólido-líquido con el uso de la energía de las microondas para extraer compuestos objetivo de diferentes matrices. La alta

temperatura y presión alcanzadas pueden causar la migración selectiva del compuesto objetivo del material a los alrededores a una tasa mayor y con rendimientos similares o mayores que las extracciones convencionales (Upadhyay y Mohan Rao, 2013).

La EAM se ha utilizado exitosamente para la extracción de ACL de diferentes fuentes como: capullos y flores secas de madreselva (Zhang *et al.*, 2008a; Hu *et al.*, 2009), hojas de tabaco (Li *et al.*, 2010) y granos verdes de café (Upadhyay *et al.*, 2012). En todos los casos se encontraron ventajas de la EAM sobre la extracción convencional, como el menor consumo de solvente y menor tiempo de extracción. Sin embargo, las condiciones óptimas de extracción dependen del equipo utilizado y de la matriz de la cual se extrae el compuesto. Por ello se evaluó el efecto de diferentes variables (solvente, concentración del solvente y tiempo de extracción) sobre la recuperación de ACL de la PC mediante EAM.

Como primer paso se evaluó el efecto del solvente sobre la extracción de ACL. Se observó que el etanol tiene una mayor eficiencia de extracción de ACL de la PC (Figura 7.3A). Cuando se evaluaron diferentes concentraciones de solvente, se encontró que la mayor extracción de ACL se obtuvo con etanol al 50%, por lo que se utilizó esta concentración de solvente para los experimentos posteriores. Un incremento o disminución de la concentración de etanol reduce significativamente la cantidad de ACL extraído de la PC. Una particularmente baja cantidad de ACL (0.302 mg/g PC) se extrajo cuando se utilizó etanol anhidro como solvente (Figura 7.3B).

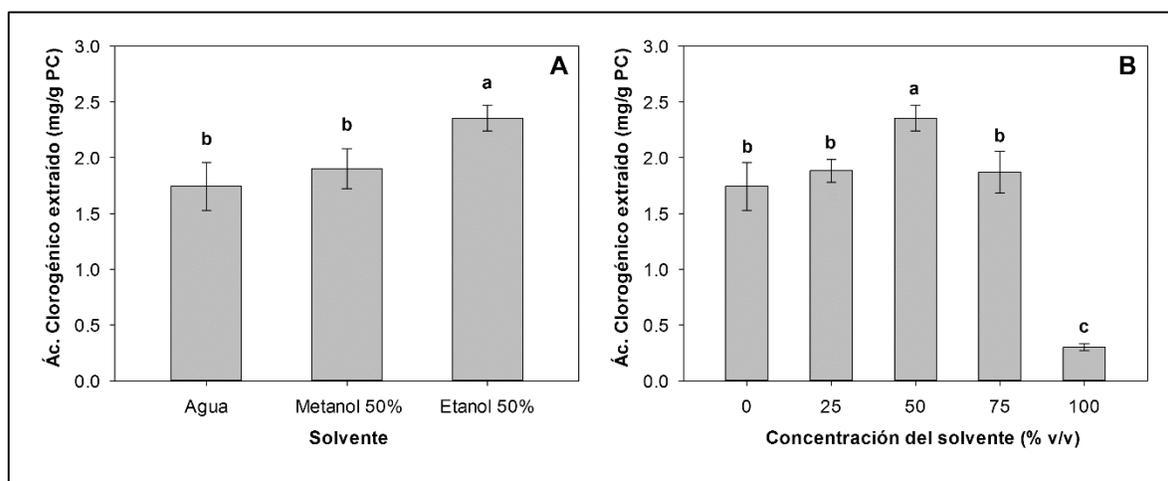


Figura 7.3 Efecto del solvente (A) y de la concentración del solvente (B) sobre la extracción de ACL de la PC por EAM (extracciones realizadas a 4 min a 50 °C).

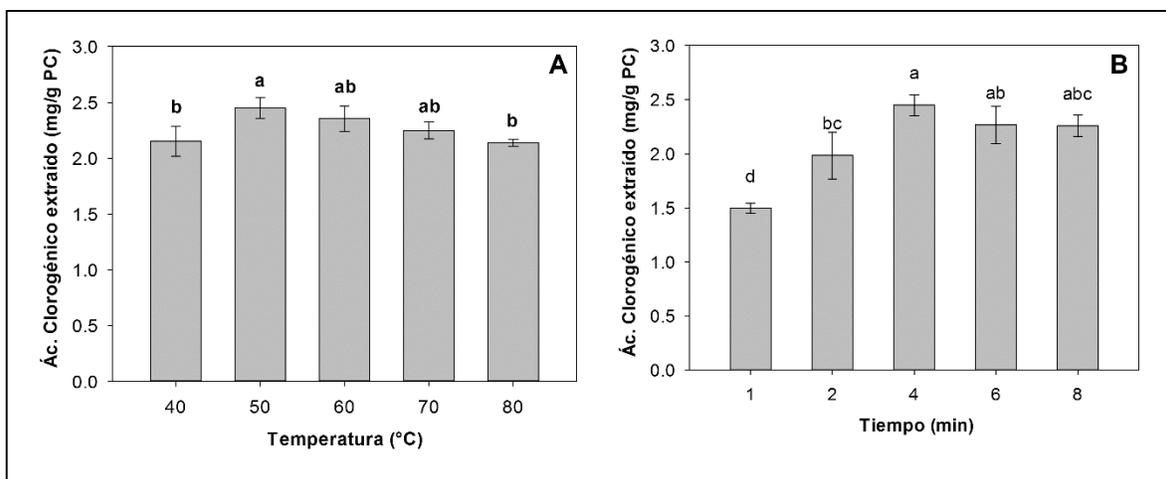


Figura 7.4 Efecto de la temperatura (A) y el tiempo de extracción (B) sobre la recuperación de ACL de la PC por EAM.

La selección del solvente utilizado depende de la solubilidad del compuesto objetivo (ACL) así como de las propiedades eléctricas del solvente (constante dieléctrica). El ACL es más soluble en alcoholes menores (metanol, etanol) y en mezclas de estos alcoholes con agua que en agua pura (Upadhyay y Mohan Rao, 2013). Por otra parte, la absorción de la energía de las microondas se incrementa conforme aumenta la constante dieléctrica del solvente, haciendo más eficiente el calentamiento (Zhang *et al.*, 2008a).

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la extracción de ACL de la PC por EAM (Figura 7.4A). La mayor extracción de ACL se obtuvo a 50 °C, a temperaturas más elevadas (60-70 °C) no se observó un incremento en la extracción de ACL y a 80°C se observó una disminución en la cantidad de ACL extraído. Generalmente, el incremento de la temperatura favorece la extracción del compuesto objetivo durante la EAM, ya que incrementa la solubilidad y favorece la ruptura celular. Sin embargo, a altas temperaturas el ACL es susceptible a la degradación térmica. Este efecto ha sido observado a temperaturas superiores a 50 °C durante la extracción de ACL de granos verdes de café por EAM (Upadhyay *et al.*, 2012).

Finalmente se estudió el efecto del tiempo de extracción (1-8 min) sobre la recuperación de ACL por EAM (Figura 7.4B). La mayor extracción de ACL se alcanzó a los 4 min. Después de los 4 min se observó una disminución en la cantidad de ACL extraído,

probablemente debido a la descomposición térmica de este compuesto. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En las mejores condiciones de extracción (4 min, 50 °C, 50% de etanol) se extrajeron 2.449 mg de ACL/g PC. Esto corresponde al 57.8% del ACL obtenido mediante extracciones sucesivas con hexano, metanol e hidrólisis alcalina. Una simple extracción adicional con etanol al 50% (10 mL, 1 min a temperatura ambiente en vórtex) permitió extraer hasta el 71.6% del ACL total en una fracción del tiempo requerida para la extracción convencional. La EAM permitió una alta recuperación del ACL de la PC en un corto tiempo de extracción. El proceso fue sencillo, reproducible y se evitó el uso de solventes tóxicos, por lo que se seleccionó esta metodología para la extracción preparativa del ACL de la PC.

7.4.3 Purificación del ACL de la PC

El ACL extraído de la PC por EAM fue purificado parcialmente usando cromatografía en Amberlita XAD-16 y en una columna C18 semi-preparativa. Se realizó una serie de experimentos semi-cuantitativos para seleccionar la fase estacionaria y el régimen de elución. En la Tabla 7.1 se muestra el rendimiento obtenido en el procedimiento final utilizado para la purificación del ACL.

El extracto etanólico seco tuvo una baja concentración de ACL (11.3 mg/g de extracto). Debido a la baja concentración de ACL y la baja solubilidad del extracto crudo, la purificación directa de este extracto por HPLC semi-preparativo no fue conveniente. Por ello, se utilizó una cromatografía en columna para concentrar el ACL y eliminar contaminantes mayores del extracto, como los azúcares y otros compuestos polares.

Tabla 7.1 Purificación de ACL a partir de un extracto etanólico de PC obtenido por EAM

	Peso (g)	Pureza (% p/v)	Factor de purificación	ACL total (mg)	Recuperación (%)
Extracto crudo	8.791	1.13	1.0	99.6	100.0
Extracto libre de azúcares	1.656	5.90	5.2	97.7	98.0
Fracción 1 C18 Semi-preparativa	0.07	61.71	10.5	43.2	43.4

Se probaron dos fases estacionarias para la concentración del ACL (Amberlita XAD-16 y Sephadex LH20). Inicialmente, la muestra se eluyó con un gradiente escalonado de etanol (0-100% v/v). La separación en Sephadex fue lenta debido probablemente al tamaño de partícula, lo que ocasionó flujos bajos del eluyente. Además, con esta metodología sólo se recuperó el 16% del ACL inyectado. En el caso de la cromatografía en Amberlita XAD-16 se logró recuperar cerca del 100% del ACL inyectado, pero éste se distribuyó en varias fracciones. Cuando se utilizó etanol al 96% (v/v) como eluyente, también se recuperó cerca del 100% del ACL inyectado, pero éste se concentró en un solo volumen de columna.

En el protocolo final, el extracto crudo (8.791 g) se disolvió en agua (100 mL) y se aplicó a una columna empacada con 250 mL de Amberlita. Se eluyó con 1000 mL de etanol (96% v/v) y la fracción rica en ACL (fracción 1) se recuperó en un volumen de columna (250 mL). Esta fracción se evaporó y se secó para obtener 1.656 g de un extracto de PC libre de azúcares con una concentración de 59 mg de ACL por g de extracto.

La Amberlita XAD-16 es una resina de adsorción no iónica formada por un copolímero de estireno y divinilbenceno. Se ha utilizado para la recuperación de flavonoides, taninos y ácidos fenólicos (Tomás-Barberán *et al.*, 1992; Schieber *et al.*, 2003; Parejo *et al.*, 2004; Seeram *et al.*, 2005). La Amberlita es utilizada para retener los compuestos fenólicos y eliminar compuestos polares como azúcares, pectinas entre otros. Los compuestos fenólicos son eluidos con solventes polares como etanol, metanol o acetona. Esta metodología permite obtener un extracto libre de azúcares y rico en compuestos fenólicos. Para el aislamiento de compuestos puros se requiere de técnicas con mayor resolución, como la cromatografía líquida contra-corriente y el HPLC preparativo.

Se evaluó el uso de HPLC semi-preparativo para la purificación del ACL a partir del extracto de PC libre de azúcares. En un primer intento, se utilizó un método isocrático con una fase móvil compuesta de agua-metanol-ácido acético (74.1:25:0.9). El ACL se eluyó en una fracción con tiempo de retención entre 28 y 38 minutos. Sin embargo, se detectaron compuestos con tiempos de retención de hasta 285 min, por lo que la separación cromatográfica se prolongó hasta por 5 h (Figura 7.5a).

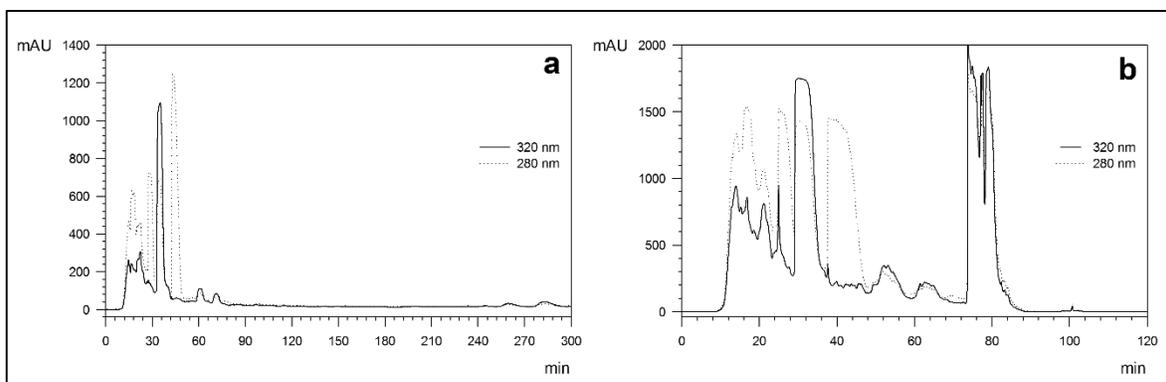


Figura 7.5 Cromatogramas semi-preparativos del extracto libre de azúcares usando un método isocrático (a) y de gradientes (b).

Con la finalidad de reducir el tiempo de separación, se utilizó un método en gradientes. Con este método el tiempo de la separación se redujo a 2 h (Figura 7.5b). La fracción con tiempo de retención de 28-38 min se colectó, se evaporó y se secó para obtener un extracto parcialmente purificado. Este extracto se utilizó como sustrato para la síntesis enzimática de CAPE en el capítulo 9.

Los cromatogramas analíticos del extracto parcialmente purificado mostraron un solo pico. Este pico corresponde con el tiempo de retención y el espectro UV del ACL (Figura 7.6) pero el análisis cuantitativo indicó una pureza del 61.7%. Esto se puede deber a que las impurezas presentes son insolubles en el solvente utilizado (metanol-ácido acético-agua, 25:0.9:74.1, V/V), no se separan en el método cromatográfico utilizado o no absorben en la longitud de onda observada (280 y 320 nm). Para identificar las impurezas presentes en el extracto de PC parcialmente purificado se requiere de un análisis más detallado, por ejemplo, mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas.

Lee *et al.* (2015) establecieron un método para la purificación rápida de ACL a partir de peras inmaduras. El método propuesto consiste en extracción líquido-líquido con acetato de etilo, separación cromatográfica en una columna empacada con la resina Diaion HP-20 y HPLC preparativo en una columna ODS. Ellos obtuvieron un compuesto con una pureza del 91.3% y una recuperación del 63.9%. Estos valores de pureza y rendimiento son superiores a los alcanzados con el protocolo propuesto. Estas diferencias pueden deberse al mayor contenido de ACL del extracto crudo utilizado y a la mayor purificación obtenida con la resina Diaion HP-20 con respecto a la Amberlita.

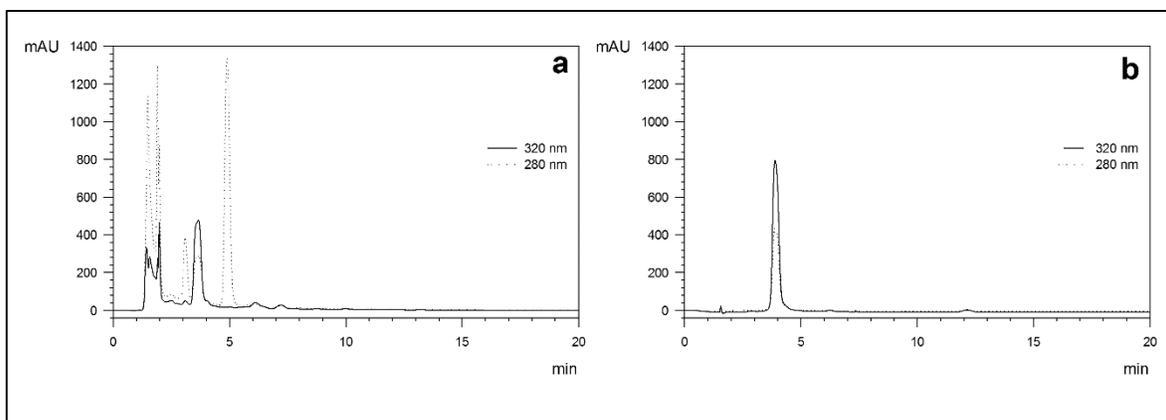


Figura 7.6 Cromatogramas analíticos del extracto libre de azúcares (a) y el extracto parcialmente purificado por HPLC semi-preparativo (b).

Amberlita XAD-16 y Diaion HP-20 son resinas no iónicas macroporosas formadas por un copolímero de estireno-divinil benceno. Las principales diferencias entre ambas resinas son el tamaño de poro (100 y 260 Å para Amberlita XAD-16 y Diaion HP-20, respectivamente) y el área superficial específica (800 y 500 m²/g para Amberlita XAD-16 y Diaion HP-20, respectivamente). El principio de adsorción de ambas resinas es similar, pero se ha observado una mayor capacidad de adsorción para Diaion HP-20 con respecto a Amberlita XAD-16 (Shimizu y Li, 2005).

Con la metodología desarrollada se obtuvo un extracto enriquecido en ACL con una pureza del 61.7% de ACL. Esta pureza es mayor a la del ACL que se vende como suplemento alimenticio o como materia prima a granel, el cual tiene una pureza del 20 al 50% (www.alibaba.com). El extracto obtenido se puede utilizar para las aplicaciones comerciales de los extractos de café verde, o como sustrato para la síntesis de compuestos de alto valor añadido, como el CAPE. Un ejemplo de esta aplicación se describe en el capítulo 9.

7.5 Conclusiones

En este capítulo se diseñó una estrategia para extraer y purificar el ACL de la PC. La extracción acuosa después de un tratamiento térmico en autoclave condujo a la extracción rápida y eficiente del ACL (72.6% del ACL total), pero el proceso fue difícil de controlar. El tratamiento enzimático con pectinasas después del autoclavado de la PC produjo una hidrólisis parcial del ACL extraído. Esta metodología es útil para la extracción de AC y AQ,

pero no para la obtención de ACL. La EAM permitió una alta recuperación del ACL de la PC (71.6% del ACL total) en un corto tiempo de extracción (4 min). El proceso fue sencillo, reproducible y se evitó el uso de solventes tóxicos, por lo que se seleccionó esta metodología para la extracción preparativa del ACL de la PC.

La metodología propuesta para la purificación del ACL basada en la adsorción en Amberlita y HPLC preparativo permitió la obtención un extracto rico en ACL con una pureza del 61.7%, mediante un proceso rápido y sencillo.

8. Producción de extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa

8.1 Resumen

La clorogenato hidrolasa (E.C. 3.1.1.42) es una enzima que cataliza la hidrólisis del ACL produciendo cantidades equimolares de AC y AQ. Esta enzima se ha utilizado principalmente para la producción de AC a partir de subproductos agroindustriales ricos en ACL, como la PC. Pero también puede utilizarse para catalizar la síntesis de ésteres del AC, como el CAPE. Sin embargo, la falta de clorogenato hidrolasas comerciales dificulta el desarrollo de estas aplicaciones. En este capítulo se describe la producción de extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa producida por hongos en FMS.

Se desarrolló una nueva técnica en placas de agar para la selección de microorganismos productores de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa basada en la oxidación del ACL residual con una solución acuosa de hidróxido de amonio. Las 10 cepas fúngicas evaluadas (9 del género *Aspergillus* y 1 del género *Rhizomucor*) fueron capaces de crecer en un medio de cultivo con ACL como única fuente de carbono, pero sólo las cepas del género *Aspergillus* produjeron halos de aclaramiento debido a la hidrólisis de ACL. Estas cepas fueron utilizadas para la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa en FMS.

La FMS se llevó a cabo en viales de 4 mL y en reactores tubulares de lecho empacado. Se usó agrolita como soporte inerte, la cual se impregnó con un medio de cultivo con extracto de café verde como inductor. Se observaron dos patrones de producción de actividad clorogenato hidrolasa. Las cepas de *A. awamori*, *A. tamaritii* y *A. oryzae* alcanzaron la máxima actividad clorogenato hidrolasa dentro de las primeras 24 h, pero la actividad decayó rápidamente. Las cepas de *A. japonicus* y *A. niger* alcanzaron la máxima actividad clorogenato hidrolasa a partir de las 24 h la cual permanece estable hasta el final del cultivo (72 h). Se encontraron diferencias significativas en los perfiles de producción, actividad máxima y productividad de la actividad clorogenato hidrolasa. Sin embargo, estas diferencias no fueron determinantes para seleccionar un microorganismo. Por ello, los extractos producidos por las 9 cepas del género *Aspergillus* se probaron como catalizadores para la síntesis de CAPE en el capítulo 9.

8.2 Introducción

La clorogenato hidrolasa es una enzima (EC 3.1.1.42) que hidroliza el ACL y otros ácidos cafeoil quínicos a AC y AQ. A diferencia de las FAEs, la clorogenato hidrolasa no actúa sobre ésteres de AF, AS y ApC (Mateos *et al.*, 2009).

Las principales aplicaciones de la clorogenato hidrolasa se basan en su actividad hidrolítica. Por ejemplo, para evitar el oscurecimiento de frutas y vegetales, para reducir la amargura de jugos de frutas o para la extracción de AC a partir de residuos agroindustriales con alto contenido de ACL, como la PC y el bagazo de manzana (Benoit *et al.*, 2007; Mateos *et al.*, 2009). Por otra parte, la clorogenato hidrolasa puede ser usada para la síntesis de ésteres bioactivos del AC, como el CAPE (Kishimoto *et al.*, 2005).

Se ha reportado la producción de clorogenato hidrolasa por hongos del género *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. japonicus*, *A. ochraceus* y *A. sojae* (Schöbel y Pollmann, 1980; Okamura y Watanabe, 1982; Asther *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2008); y bacterias como *Acinetobacter* sp., *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli* y *Lactobacillus gasseri* (Couteau *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003).

La clorogenato hidrolasa de *A. japonicus* fue comercializada por la empresa japonesa Kikkoman Co. hasta hace algunos años. Sin embargo, este producto está fuera del mercado y actualmente no se conocen fuentes comerciales de clorogenato hidrolasa.

Las aplicaciones de la clorogenato hidrolasa en reacciones de hidrólisis y síntesis son atractivas. Sin embargo, la falta de fuentes comerciales de clorogenato hidrolasa dificulta el desarrollo de estas aplicaciones. Por ello, en este capítulo estudiamos la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por hongos filamentosos en un sistema de FMS.

8.3 Materiales y métodos

8.3.1 Búsqueda de microorganismos productores de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa

Se realizó una búsqueda de microorganismos productores de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa. Se utilizaron 10 cepas fúngicas (9 del género *Aspergillus* y 1 del género *Rhizomucor*). Estas cepas fueron obtenidas de la colección de microorganismos del

Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila, de la Planta Piloto 4 de la Universidad Autónoma Metropolitana, de la Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL, U.S.A.) y de la Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, España (Tabla 8.1). Estas cepas se seleccionaron debido a su capacidad para crecer en medios con alto contenido de compuestos fenólicos.

Tabla 8.1 Microorganismos utilizados para la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa

Microorganismo	Colección	Origen
<i>Aspergillus awamori</i> 3112	NRRL	Granos de trigo
<i>Aspergillus japonicus</i> AN5	DIA-UAdeC	Suelo cercano a un eucalipto
<i>Aspergillus niger</i> CH4	PP4-UAM	Pulpa de henequen
<i>Aspergillus niger</i> GH1	DIA-UAdeC	Hojas de gobernadora
<i>Aspergillus niger</i> HT4	DIA-UAdeC	Tronco de eucalipto
<i>Aspergillus niger</i> PSH	DIA-UAdeC	Hojas de pino silvestre
<i>Aspergillus oryzae</i> 2094	CECT	Tane-Koji
<i>Aspergillus oryzae</i> 2095	CECT	Salsa de soya
<i>Aspergillus tamaritii</i> V12307	PP4-UAM	Plantación de café
<i>Rhizomucor pusillus</i> 23aIV	PP4-UAM	Copra de coco

Las esporas se activaron en matraces con agar papa-dextrosa y los cultivos se incubaron durante 7 días a 30 °C. Posteriormente, se agregaron 20 mL de Tween 80 al 0.1% (v/v) estéril y se suspendieron las esporas con ayuda de un agitador magnético. La concentración de esporas en la suspensión se contó y se ajustó a 1×10^7 esporas/mL con agua destilada. Se tomaron 10 μ L de esta suspensión de esporas y se utilizaron para inocular cajas con 20 mL de medio agar Asther modificado. El medio utilizado estuvo compuesto por (en g/L): Tartrato de diamonio, 1.842; extracto de levadura, 0.5; KH_2PO_4 , 0.2; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0132; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; ACL, y agar, 15 g/L. Las placas se incubaron durante 5 días a 30 °C. Se midió el crecimiento radial cada 24 h. La hidrólisis del ACL se reveló con el uso de NH_4OH . A los 3 días de incubación se retiraron 2 cajas de cada cepa, se agregaron 2.5 mL de NH_4OH al 28%. Se agitó durante 30 segundos, y después se eliminó el exceso de solución.

Se observó una coloración verde en las zonas con presencia de ACL y una coloración amarilla en las zonas sin ACL (Figura 8.1).

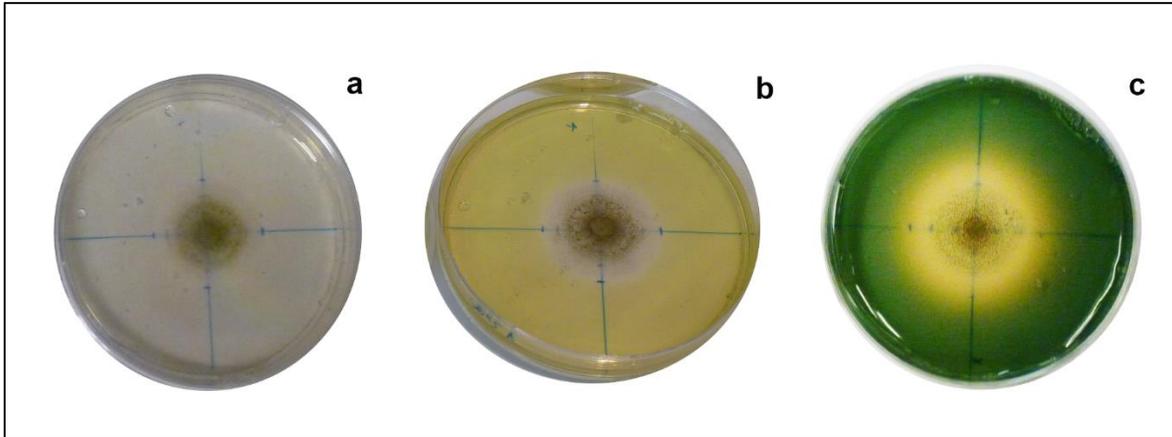


Figura 8.1 Técnica de crecimiento radial y halos de hidrólisis: a) Crecimiento radial después de 3 días de incubación; b) Placa después de la adición de NH_4OH al 28%; c) Placa después de la incubación con NH_4OH al 28% durante 2 h.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente en la campana de extracción de vapores y después de 2 h se midieron los halos de hidrólisis producidos. Se determinó el índice de potencia con la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{D_H}{D_C} \quad \text{Ecuación 8.1}$$

En donde: IP = Índice de potencia, D_H = Diámetro del halo aclaramiento debido a hidrólisis de ACL y D_C = Diámetro de la colonia.

8.3.2 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en viales

Se estudió la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa en un sistema de FMS en pequeña escala. El cultivo se llevó a cabo en viales de 4 mL con 0.3 g de agrolita (malla 12-16) como soporte sólido y 0.5 mL de medio líquido Asther modificado. El medio Asther modificado está compuesto por: Tartrato de diamonio (1.842 g/L), extracto de levadura (0.5 g/L), KH_2PO_4 (0.2 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0132 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L), maltosa (2.0 g/L) y extracto de café verde (15.0 g/L). El medio de cultivo se inoculó con 1×10^7 esporas/mL de medio y se incubaron durante 5 días a 30 °C.

Se tomaron muestras por duplicado cada 24 h. Se mezcló el contenido de cada vial con 2 mL de buffer de fosfatos (50 mM pH 6.5), se agitó durante 1 min en vórtex, el sobrenadante se decantó y se repitió el procedimiento una vez más. El extracto obtenido (4.0-4.5 mL) se centrifugó durante 10 min a 10 000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de membranas de celulosa regenerada de 0.22 μm y el líquido filtrado se analizó en HPLC para determinar el contenido de ACL y AC, así como para la determinación de actividad clorogenato hidrolasa.

8.3.3 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en columnas

La producción de clorogenato hidrolasa se llevó a cabo en reactores empacados con aireación forzada (columnas de vidrio de 2.3 cm de diámetro interno). Se preparó medio Asther sin inductor a una concentración 2X y se esterilizó en autoclave (15 min, 15 lb). El medio se suplementó con 30 g/L de extracto de café verde (concentración final = 15 g/L) y se filtró a través de membranas de celulosa estériles con un tamaño de poro de 0.45 μm . El medio se inoculó con una suspensión de esporas para tener una concentración final de 1×10^7 esporas/mL. Se agregó el agua destilada estéril necesaria para diluir el medio a una concentración 1X. En un vaso de precipitados se colocaron 60 g de agrolita estéril y se mezclaron con 100 mL de medio Asther previamente inoculado. El material se homogenizó y se empacó en columnas de vidrio de 2.3 cm de diámetro. Las columnas se incubaron durante 40 h a 30 °C con una aireación forzada de 10 mL/min.

Durante la incubación, se registró la producción de CO₂ y el consumo de O₂ mediante un respirómetro construido y patentado en nuestro laboratorio (Torres-Mancera, 2013) . Se retiraron 2 columnas de cada cepa a las 14, 24 y 40 h de incubación. El material fermentado se retiró de las columnas, se homogenizó y se tomaron muestras de 1 g de materia húmeda por columna. Se mezcló el contenido de cada muestra con 2.5 mL de buffer de fosfatos (50 mM pH 6.5), se agitó durante 1 min en vórtex, el sobrenadante se decantó y se repitió el procedimiento una vez más. El extracto obtenido (4.5-5.0 mL) se centrifugó durante 10 min a 10 000 rpm. El sobrenadante se filtró a través de membranas de celulosa regenerada de 0.22 μm y el líquido filtrado se analizó en HPLC para determinar el contenido de ACL y AC, así como para la determinación de actividad clorogenato hidrolasa.

8.3.5 Métodos analíticos

Análisis de AC y ACL

La cuantificación de los AC y ACL se hizo mediante un método cromatográfico. La separación se llevó a cabo en un equipo de HPLC Shimadzu Prominence descrito anteriormente (sección 6.3.4). La separación se llevó a cabo en una columna Restek Ultra C18 (150 x 3.2 mm). Se utilizó un método isocrático, con una fase móvil compuesta por metanol (25 %), ácido acético (0.9 %) y agua (74.1 %) a un flujo de 0.5 mL/min. La detección se hizo a 320 nm. Se construyeron curvas patrón de cada uno de los estándares (AC y ACL) en concentraciones de 0.002 a 0.5 mg/mL.

Análisis de maltosa, glucosa y AQ

La cuantificación de maltosa, glucosa y AQ se realizó mediante HPLC. La separación se llevó a cabo en un equipo de HPLC Shimadzu Prominence descrito anteriormente (sección 6.3.4). La separación se llevó a cabo en una columna Aminex HPX-87H (300 x 7.8 mm). Se utilizó un método isocrático con H₂SO₄ 5 mM como fase móvil a un flujo de 0.6 mL/min a 65 °C. El AQ se detectó por absorbancia a 210 nm usando un detector de arreglo de diodos a 30 °C. La maltosa y la glucosa se midieron con un detector de índice de refracción (Shimadzu RID-20A).

Determinación de la actividad clorogenato hidrolasa

La actividad clorogenato hidrolasa se cuantificó utilizando ACL como sustrato. Se colocaron 900 µL de ACL 5 mM en buffer de fosfatos (50 mM pH 6.5). Se agregaron 100 µL de extracto enzimático y se incubó durante 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo agregando 1 mL de metanol. La mezcla de reacción se filtró a través de membranas de celulosa regenerada de 0.2 µm de poro y se inyectó a un equipo de HPLC para cuantificar la liberación de AC durante la reacción enzimática. Se prepararon tubos control en los que el extracto enzimático se agregó después de detener la reacción.

Humedad y pH

La humedad se midió en un analizador de humedad Ohaus MB45. Se midió la pérdida de peso a 110 °C hasta alcanzar una pérdida de peso menor a 1 mg en 90 segundos. El pH se

determinó de acuerdo a la Norma Mexicana NMX-AA-025-1984 con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de muestra húmeda en un vaso de precipitados de 50 mL se agregaron 9 mL de agua destilada y se agitó durante 10 min con un agitador magnético. Se dejó reposar durante 30 min y se midió el pH del sobrenadante con un potenciómetro previamente calibrado.

8.3.6 Estimación de parámetros cinéticos

El crecimiento se estimó indirectamente mediante respirometría, como fue descrito por Torres-Mancera (2013). La producción de CO₂ se modeló utilizando la ecuación logística. El consumo de O₂ se describió con el modelo de Pirt (1975) y la formación de producto (actividad clorogenato hidrolasa) se describió con el modelo de Luedeking y Piret (1959) siguiendo un procedimiento similar al utilizado por Soto-Cruz *et al.* (2002) pero utilizando los datos de CO₂ en lugar de los de biomasa. Para el modelamiento del proceso (CO₂, O₂ y actividad clorogenato hidrolasa) se hicieron las siguientes consideraciones:

- La tasa de producción de CO₂ (dCO_2/dt) es proporcional a la tasa de crecimiento en el periodo evaluado (40 h).
- La producción máxima de CO₂ (CO_{2 max}) es proporcional a la máxima concentración de biomasa (X_{max}).
- Los rendimientos de CO₂/biomasa (Y_{CO₂/X}) y de CO₂/O₂ (Y_{CO₂/O₂) son constantes en el periodo observado (40 h).}
- El coeficiente de consumo de sustrato no asociado al crecimiento (γ) corresponde a la fracción de O₂ por unidad de CO₂ y por h consumido que se destina a funciones diferentes a las del crecimiento y es constante en el periodo observado (40 h).
- Si este modelo simple sirve para simular los datos experimentales, es posible que las consideraciones anteriores sean correctas.

La producción de CO₂ se describió por el modelo logístico:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \mu_{CO_2} \cdot CO_2 \left(1 - \frac{CO_2}{CO_{2max}} \right) \quad \text{Ecuación 8.2}$$

$$CO_2 = \frac{CO_{2max}}{1 + \left(\frac{CO_{2max}}{CO_{20}} - 1 \right) \exp(-\mu_{CO_2} t)} \quad \text{Ecuación 8.3}$$

En donde dCO_2/dt es la tasa de producción de CO_2 , μ_{CO_2} es la tasa específica de producción de CO_2 , CO_2 es la producción acumulada de CO_2 y CO_{2max} es la máxima producción de CO_2 . Los datos de producción de CO_2 se integraron aplicando la regla del trapecio para obtener la cantidad de CO_2 total producido por g de ms. Los resultados integrados se ajustaron a la ecuación integrada del modelo logístico (Ecuación 8.3) por minimización de la sumatoria de los errores al cuadrado. Se utilizó el algoritmo de Gradiente Reducido Generalizado (GRG) con la función Solver de Excel 2013 (Microsoft, Redmond, WA).

El consumo de O_2 estimó usando el modelo de Pirt (1975):

$$-\frac{dO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{CO_2/O_2}} \frac{dCO_2}{dt} + m_{O_2} CO_2 \quad \text{Ecuación 8.4}$$

$$O_{20} - O_2 = \frac{1}{Y_{CO_2/O_2}} (CO_2 - CO_{20}) + m_{O_2} \frac{CO_{2max}}{\mu_{CO_2}} \ln \left(\frac{CO_{2max} - CO_{20}}{CO_{2max} - CO_2} \right) \quad \text{Ecuación 8.5}$$

En donde dO_2/dt es la tasa de consumo de O_2 , Y_{CO_2/O_2} es el rendimiento respiratorio asociado al crecimiento, m_{O_2} es el coeficiente de consumo de O_2 no asociado al crecimiento, O_{20} es el O_2 cuando $t = 0$ y CO_{20} es el CO_2 cuando $t = 0$. Los parámetros Y_{CO_2/O_2} y γ se calcularon por regresión lineal usando la ecuación 8.5.

La formación de producto (actividad clorogenato hidrolasa) se estimó con el modelo de Luedeking y Piret (1959):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dCO_2}{dt} + \beta CO_2 \quad \text{Ecuación 8.6}$$

$$P - P_0 = \alpha (CO_2 - CO_{20}) + \beta \frac{CO_{2max}}{\mu_{CO_2}} \ln \left(\frac{CO_{2max} - CO_{20}}{CO_{2max} - CO_2} \right) \quad \text{Ecuación 8.7}$$

En donde dP/dt es la tasa de formación de producto (actividad clorogenato hidrolasa), α es el coeficiente asociado al crecimiento, β es el coeficiente no asociado al crecimiento y

P_0 es la actividad clorogenato hidrolasa cuando $t = 0$. Los coeficientes α y β se calcularon por regresión lineal usando la ecuación 8.7. Los parámetros cuyo intervalo de confianza (95%) incluyó el cero, se descartaron del modelo sin afectar el ajuste.

8.4 Resultados y discusión

8.4.1 Selección de microorganismos productores de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa

Se evaluó el potencial de 10 cepas fúngicas (9 del género *Aspergillus*, y 1 del género *Rhizomucor*) para crecer en un medio de cultivo con ACL como fuente de carbono. La Figura 8.2 muestra la cinética de crecimiento radial de las diferentes cepas empleadas. Todas las cepas evaluadas fueron capaces de crecer en el medio de cultivo utilizado. Se observó un crecimiento lineal durante los 5 días del experimento. Por lo que la tasa de crecimiento radial se calculó por regresión lineal. El crecimiento superficial alcanzó un radio de 24 a 40 mm en 5 días para todas las cepas.

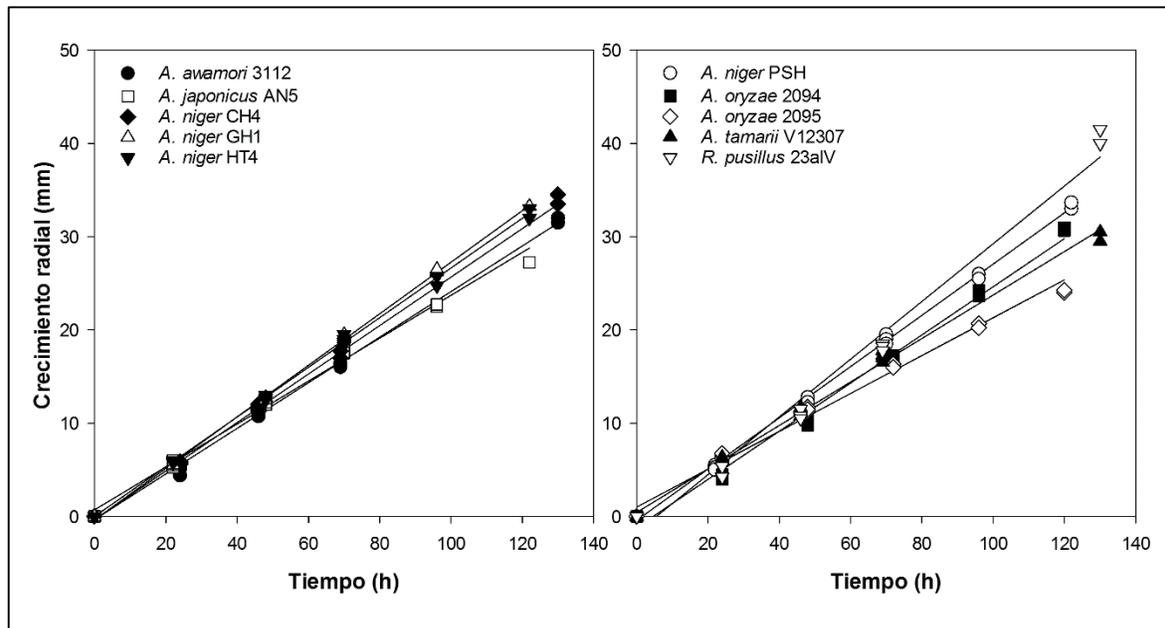


Figura 8.2 Crecimiento radial de 10 cepas fúngicas en medio agar Asther modificado, con ACL como única fuente de carbono.

En la Tabla 8.2 se muestra la tasa de crecimiento radial y el índice de potencia calculados para las 10 cepas. Se encontraron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de las diferentes cepas. La mayor tasa de crecimiento (0.282 ± 0.028 mm/h) se observó para la cepa de *R. pusillus*. La menor tasa de crecimiento radial (0.216 ± 0.008 mm/h) se observó para la cepa 2095 de *A. oryzae*.

Tabla 8.2 Crecimiento radial e índice de potencia de 10 cepas fúngicas en agar con ACL como única fuente de carbono

Microorganismo	Tasa de crecimiento radial (mm/h)	Índice de potencia
<i>Aspergillus awamori</i> 3112	0.243 ± 0.005 ^c	1.26 ± 0.02
<i>Aspergillus japonicus</i> AN5	0.242 ± 0.019 ^{cd}	1.36 ± 0.05
<i>Aspergillus niger</i> CH4	0.255 ± 0.008 ^{bc}	1.29 ± 0.03
<i>Aspergillus niger</i> GH1	0.276 ± 0.002 ^b	1.31 ± 0.11
<i>Aspergillus niger</i> HT4	0.267 ± 0.003 ^{bc}	1.28 ± 0.08
<i>Aspergillus niger</i> PSH	0.277 ± 0.002 ^b	1.23 ± 0.00
<i>Aspergillus oryzae</i> 2094	0.246 ± 0.006 ^c	1.23 ± 0.00
<i>Aspergillus oryzae</i> 2095	0.216 ± 0.008 ^d	1.27 ± 0.00
<i>Aspergillus tamaraii</i> V12307	0.240 ± 0.008 ^{cd}	1.20 ± 0.00
<i>Rhizomucor pusillus</i> 23aIV	0.282 ± 0.028 ^a	N.D.

*ND = No detectado; Letras iguales en la misma columna indica que no existen diferencias significativas (prueba de Tukey, $\alpha=0.05$). * No hay diferencias significativas de acuerdo al ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis $\alpha=0.05$).

Las tasas de crecimiento radial obtenidas (0.216-0.282 mm/h) son menores a las reportadas por otros autores usando otras fuentes de carbono, como glucosa (Larralde-Corona *et al.*, 1993) o pectina (Loera y Viniestra-González, 1998), probablemente debido a limitación de nutrientes. Larralde-Corona y colaboradores (1993) estudiaron el efecto de la concentración de glucosa y de relación C/N sobre el crecimiento radial de *A. niger*. La tasa de crecimiento radial se incrementó de 0.355 a 0.570 mm/h cuando se incrementó la concentración de glucosa inicial de 10 a 100 g/L (relación C/N = 12), mientras que para una concentración de 1 g/L de glucosa, la tasa de crecimiento radial fue de 0.298 a 0.332 independientemente de la relación C/N (Relación C/N = 0.12-120). En el presente trabajo, la única fuente de carbono (ACL) se utilizó a una baja concentración (1 g/L).

En cuanto la hidrólisis del ACL, 9 de las 10 cepas evaluadas (todas, excepto *Rhizomucor pusillus*) produjeron halos en las condiciones evaluadas. El mayor índice de potencia (1.36) se observó para *A. japonicus* AN5. Sin embargo, el análisis de varianza indicó que no existe diferencia significativa entre los índices de potencia producidos por los 9 microorganismos.

El crecimiento radial sobre medios de cultivo selectivo y la formación de halos de hidrólisis se ha utilizado para identificar microorganismos productores de feruloil esterasa (Pérez-Morales *et al.*, 2011), tanasa (Bradoo *et al.*, 1996), elagitanasa (de la Cruz *et al.*, 2015), entre otras enzimas. Sin embargo, no se ha reportado el uso de esta técnica para identificar microorganismos productores de clorogenato hidrolasas.

El crecimiento radial en agar con ACL como única fuente de carbono y la formación de halos de hidrólisis permitió identificar microorganismos con potencial para la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa, pero no fue posible seleccionar una cepa con estos criterios. Las 9 cepas del género *Aspergillus* produjeron halos de hidrólisis de ACL, por lo que se utilizaron para la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa un sistema de FMS en pequeña escala. La cepa de *Rhizomucor pusillus* no produjo halos de hidrólisis, pero se utilizó como control negativo en los siguientes experimentos.

8.4.2 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en viales

Se evaluó la capacidad de 10 cepas fúngicas para consumir ACL y producir enzimas con actividad clorogenato hidrolasa en un sistema de FMS usando viales de 4 mL como bioreactores. La FMS se llevó a cabo utilizando agrolita como soporte inerte y un medio de cultivo con extracto de café verde como fuente de carbono y de inductores.

La Figura 8.3 muestra los perfiles de consumo de ACL de las diferentes cepas en FMS. Las cepas del género *Aspergillus* consumieron totalmente el ACL en menos de 24 h, mientras que la cepa de *Rhizomucor pusillus* sólo consumió el 14 % del ACL inicial al final del cultivo (72 h).

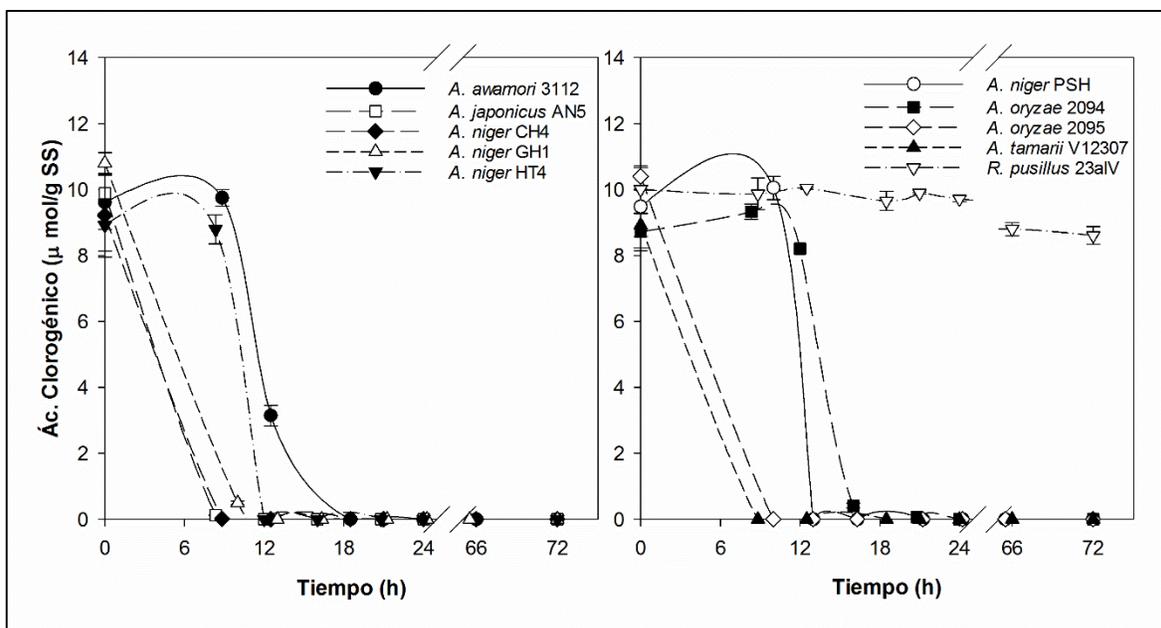


Figura 8.3 Consumo de ACL durante la FMS en viales

Durante la FMS con hongos del género *Aspergillus* se observó la acumulación de AC durante las primeras horas de incubación (Figura 8.4). Estos resultados sugieren que, durante la FMS con hongos del género *Aspergillus*, el ACL es hidrolizado antes de ser absorbido y consumido. La acumulación de AC libre en el medio de cultivo es un indicativo de la presencia de enzimas extracelulares con actividad clorogenato hidrolasa. Se observó un grupo de microorganismos en donde la hidrólisis total del ACL se llevó a cabo en menos de 12 h (*A. japonicus* AN5, *A. niger* CH4 *A. oryzae* 2095 y *A. tamarii* V12307), otro grupo de cepas consumen completamente el ACL en 12 h (*A. niger* GH1, HT4 y PSH) y finalmente el grupo de microorganismos que no hidrolizan por completo el ACL incluso a las 16 h de incubación (*A. awamori*, *A. oryzae* 2094 y *R. pusillus*).

Se observó la acumulación de AC durante la FMS con las diferentes cepas del género *Aspergillus*. La mayor acumulación de AC (10.72-22.3 $\mu\text{mol/g}$ SS) se observó entre las 8 y las 20 h de incubación. Después de alcanzar la máxima concentración, el AC es rápidamente consumido. La máxima concentración de AC alcanzada es mayor a la cantidad de ACL consumido, por lo que se alcanzaron rendimientos superiores al 100% (Tabla 8.3). Esto se debe posiblemente a la presencia de otros ácidos cafeoil-quinicos en el extracto de café. Se

ha reportado que el ACL representa alrededor del 56-62% de los ésteres de AHCs en el café verde (Farah y Donangelo, 2006).

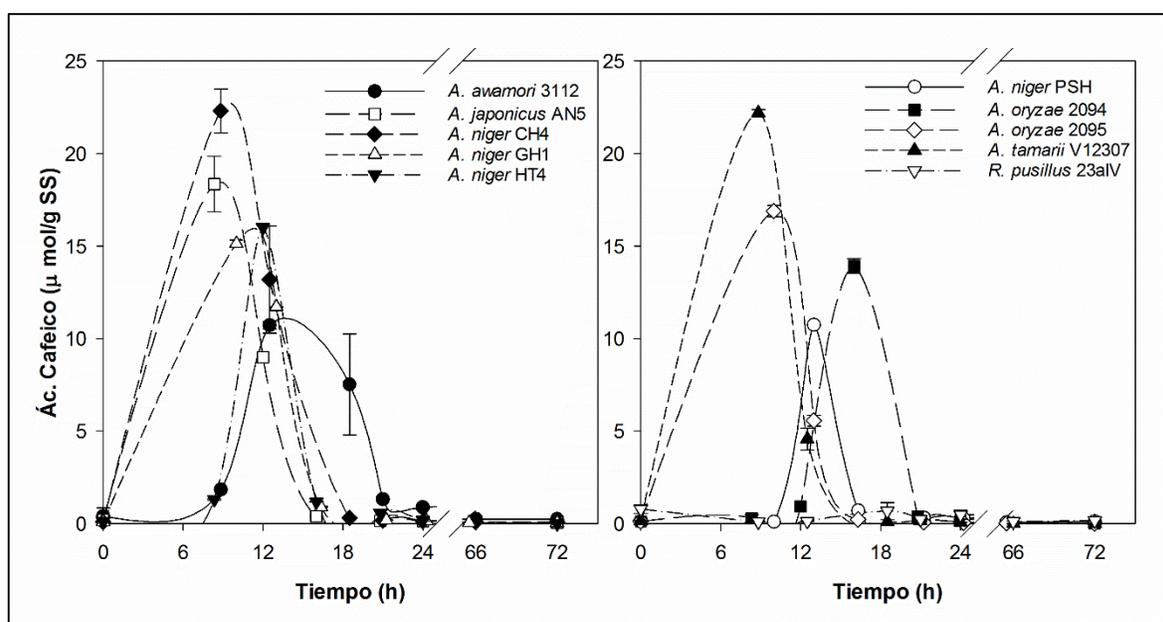


Figura 8.4 Acumulación de AC durante la FMS en viales

Tabla 8.3 Hidrólisis del ACL durante la FMS en viales

Microorganismo	ACL consumido (µmoles/g SS)*	Concentración máxima de AC producido (µmoles/g SS)	Rendimiento (%)
<i>A. awamori</i> 3112	7.05 ± 0.31	10.72 ± 0.21	152.0 ± 3.7
<i>A. japonicus</i> AN5	9.76 ± 0.60	18.35 ± 1.50	188.0 ± 3.9
<i>A. niger</i> CH4	9.21 ± 1.27	22.31 ± 1.19	243.7 ± 20.7
<i>A. niger</i> GH1	10.30 ± 0.37	15.14 ± 0.18	147.0 ± 3.5
<i>A. niger</i> HT4	8.92 ± 0.79	16.00 ± 0.00	168.8 ± 0.0
<i>A. niger</i> PSH	9.48 ± 1.24	10.73 ± 0.05	114.2 ± 14.5
<i>A. oryzae</i> 2094	8.31 ± 0.50	13.93 ± 0.40	167.9 ± 5.4
<i>A. oryzae</i> 2095	10.39 ± 0.26	16.90 ± 0.30	162.6 ± 6.9
<i>A. tamaritii</i> V12307	8.93 ± 0.35	22.20 ± 0.18	248.8 ± 7.6
<i>R. pusillus</i> 23aIV	0.35 ± 0.30	0.69 ± 0.46	223.0 ± 62.5

*ACL consumido en el momento de mayor acumulación de AC.

En la Figura 8.5 se muestran los perfiles de actividad clorogenato hidrolasa producida por las diferentes cepas durante la FMS en viales. Se observó al menos dos tipos de comportamiento. Existe un grupo de microorganismos (*A. awamori* 3112, *A. japonicus* AN5, y *A. oryzae* 2094 y las 4 cepas de *A. niger*) que alcanza la mayor actividad después de las 24

h y cuya actividad permanece estable de las 24 a las 72 h. Otro grupo (*A. oryzae* 2095, *A. tamarii* y *R. pusillus*) alcanza su mayor actividad clorogenato hidrolasa antes de las 24 h, pero dicha actividad decae a linealmente hacia el final de la fermentación. Este comportamiento puede estar relacionado a un proceso de deterioro de la enzima, ya sea por factores físicos (calor) o bioquímicos (actividad proteolítica). Sin embargo, es necesario realizar más estudios para conocer el origen de dicho deterioro.

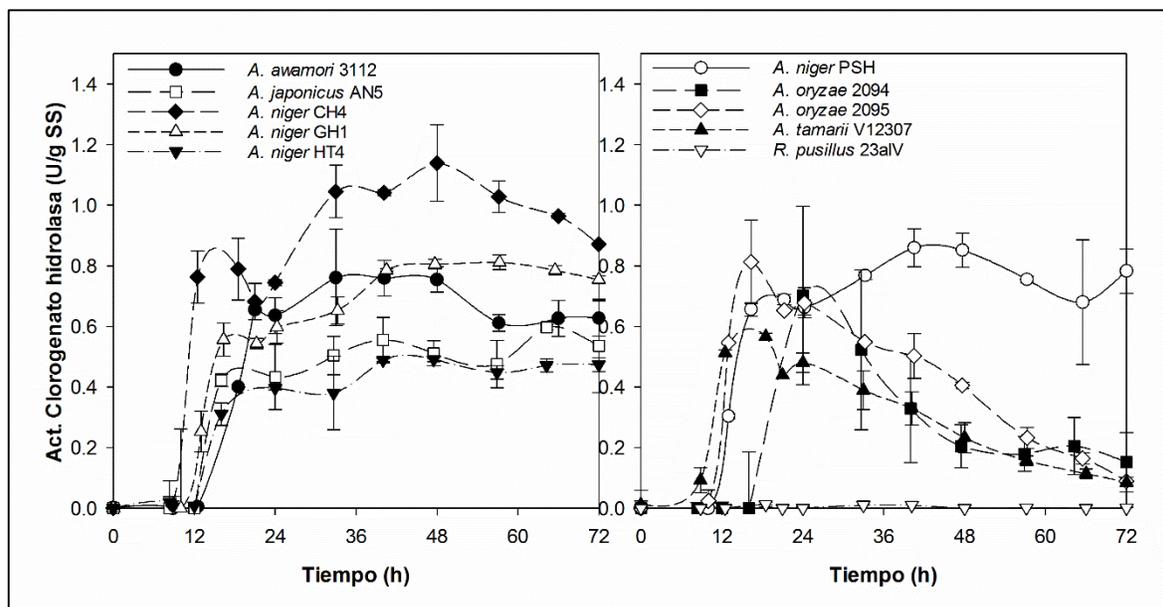


Figura 8.5 Actividad clorogenato hidrolasa durante la FMS en viales.

La mayor actividad clorogenato hidrolasa (1.14 U/g ss) en este sistema se obtuvo a las 48 h por *A. niger* CH4. Este valor es comparable con el obtenido por FMS de *A. japonicus* creciendo sobre salvado de trigo (≈ 1.05 U/g msi) (Okamura y Watanabe, 1982) y superiores a los producidos por *A. ochraceus* en FMS usando PC y bagazo de caña como soporte (0.133U/g msi) (Ramírez *et al.*, 2008).

8.4.3 Producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por FMS en columnas

El experimento en tubos viales de laboratorio permitió obtener información detallada sobre la hidrólisis del ACL, la acumulación de AC y la producción de clorogenato hidrolasa por las 10 cepas fúngicas en un sistema de FMS. Sin embargo, esta información no fue concluyente para seleccionar la mejor cepa para producir clorogenato hidrolasa. Por ello, se

estudió la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por las 9 cepas del género *Aspergillus* en un sistema de FMS en reactores de lecho empacado.

La FMS se monitoreó durante 40 h. Se tomaron muestras en diferentes tiempos de incubación para medir el consumo del sustrato y la actividad clorogenato hidrolasa. El crecimiento se estimó de manera indirecta usando datos de respirometría. Los parámetros de crecimiento se estimaron utilizando el modelo logístico. La Figura 8.6 muestra los perfiles de las tasas de producción de CO₂ de las 9 cepas durante la FMS en columnas. Se observan perfiles similares de CO₂ para la mayoría de las cepas (*A. japonicus* AN5, *A. tamarisii* V12307, *A. oryzae* 2095 y las 4 cepas de *A. niger*). Estas cepas alcanzan la máxima tasa de producción de CO₂ (de 1.73 a 2.58 mg de CO₂ /h·g ms) en un periodo de incubación de 11.2 a 12.7 h. Por otra parte, *A. awamori* y *A. oryzae* 2094 alcanzan su máxima tasa de producción de CO₂ (de 1.41 a 2.09 mg de CO₂ /h·g ms) a un tiempo de incubación más prolongado (17.2-19.9 h).

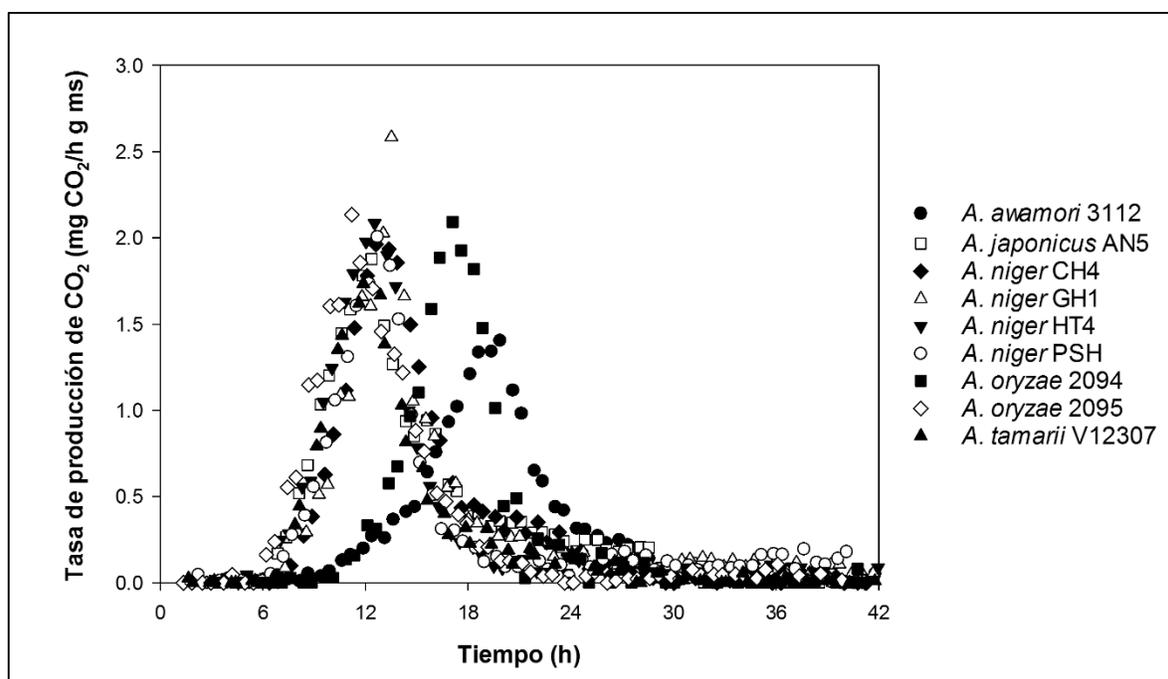


Figura 8.6 Tasa de producción de CO₂ de las 9 cepas del género *Aspergillus* durante la FMS en columnas.

En la Figura 8.7 se muestra la producción acumulada de CO₂. Los datos experimentales se señalan con los diferentes símbolos y las líneas continuas representan el ajuste del modelo logístico. La menor producción de CO₂ (experimental) se observó para A.

awamori 3112 (11.20 ± 0.23 mg/g ms), mientras que la mayor producción acumulada de CO₂ fue de 14.62 ± 0.36 mg/g ms para *A. japonicus* AN5.

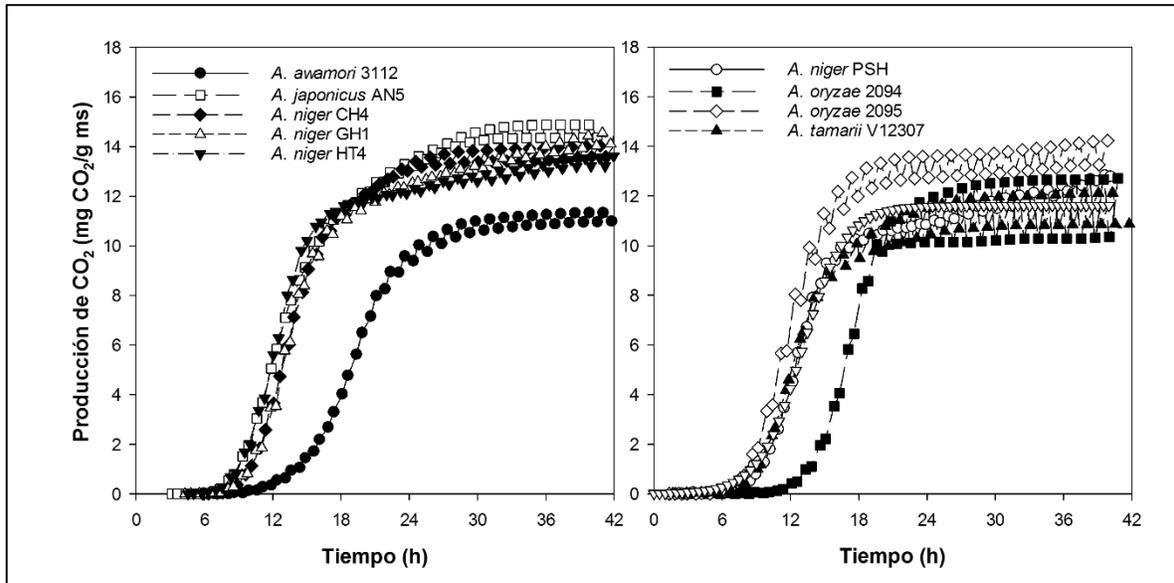


Figura 8.7 Producción de CO₂ durante la FMS en columnas

La Tabla 8.4 muestra los parámetros calculados con dicho modelo. Estos datos se ajustaron adecuadamente al modelo, con valores de R² superiores a 0.97. Los valores de CO₂ *max* estimados por el modelo fueron cercanos a los observados experimentalmente (de 11.01 a 14.18 mg de CO₂/g ms). La constante específica de producción de CO₂ (μ_{CO_2}) más baja fue la de *A. japonicus* AN5 (0.38 ± 0.01 h⁻¹) y la más alta fue de *A. oryzae* 2094 (0.64 h⁻¹) el resto de las cepas tuvieron un valor de μ_{CO_2} de 0.43 a 0.56 h⁻¹.

Tabla 8.4 Parámetros cinéticos calculados con el modelo logístico

Microorganismo	$\mu_{CO_2}^*$ h ⁻¹	CO ₂ <i>max</i> * mg/g ms	R ²
<i>A. awamori</i> 3112	0.43 ± 0.00	11.01 ± 0.28	0.9978
<i>A. japonicus</i> AN5	0.38 ± 0.01	14.18 ± 0.30	0.9899
<i>A. niger</i> CH4	0.48 ± 0.04	13.52 ± 0.30	0.9931
<i>A. niger</i> GH1	0.45 ± 0.03	13.44 ± 0.19	0.9846
<i>A. niger</i> HT4	0.56 ± 0.03	12.77 ± 0.20	0.9899
<i>A. niger</i> PSH	0.53 ± 0.05	11.62 ± 0.15	0.9866
<i>A. oryzae</i> 2094	0.64 ± 0.07	11.41 ± 1.54	0.9750
<i>A. oryzae</i> 2095	0.55 ± 0.01	13.33 ± 0.61	0.9928
<i>A. tamarii</i> V12307	0.51 ± 0.05	11.19 ± 0.83	0.9858

* No hay diferencias significativas de acuerdo al ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis $\alpha=0.05$)

La Figura 8.8 muestra los perfiles de la tasa de consumo de O_2 para las 9 cepas durante la FMS en columnas. Se observan perfiles similares a los de producción de CO_2 . Las cepas de *A. japonicus*, *A. tamaraii*, *A. niger* y la cepa 2095 de *A. oryzae* alcanzaron la máxima tasa de consumo de O_2 a las 11.2-13.5 h (de 1.33 a 1.79 mg de $O_2/h \cdot g$ ms). La cepa 3112 de *A. awamori* y 2094 de *A. oryzae* alcanzaron su máxima tasa de consumo de O_2 (1.06 y 1.45 mg de $O_2/h \cdot g$ ms) a las 18.6 y 17.1 h, respectivamente. Los datos de producción de O_2 se integraron aplicando la regla del trapecio para obtener la cantidad de O_2 total consumido por g de ms. Los resultados integrados se ajustaron al modelo de Pirt mediante regresión lineal.

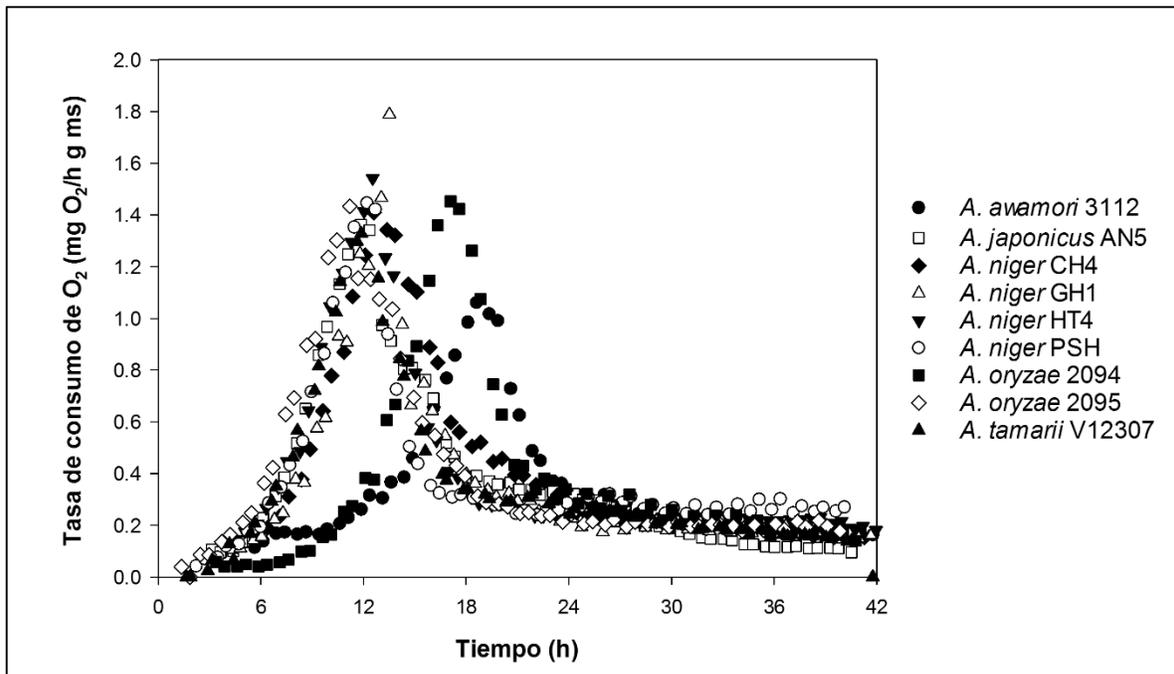


Figura 8.8 Tasa de consumo de O_2 de las 9 cepas del género *Aspergillus* durante la FMS en columnas.

En la Figura 8.9 se muestra el consumo acumulado de O_2 . Los datos experimentales se señalan con los diferentes símbolos y las líneas continuas representan el ajuste al modelo de Pirt. El menor consumo acumulado de O_2 (experimental) se observó para *A. awamori* 3112 (12.84 ± 0.03 mg/g ms), mientras que el mayor consumo de O_2 fue de 16.01 ± 0.30 mg/g ms para *A. niger* HT4.

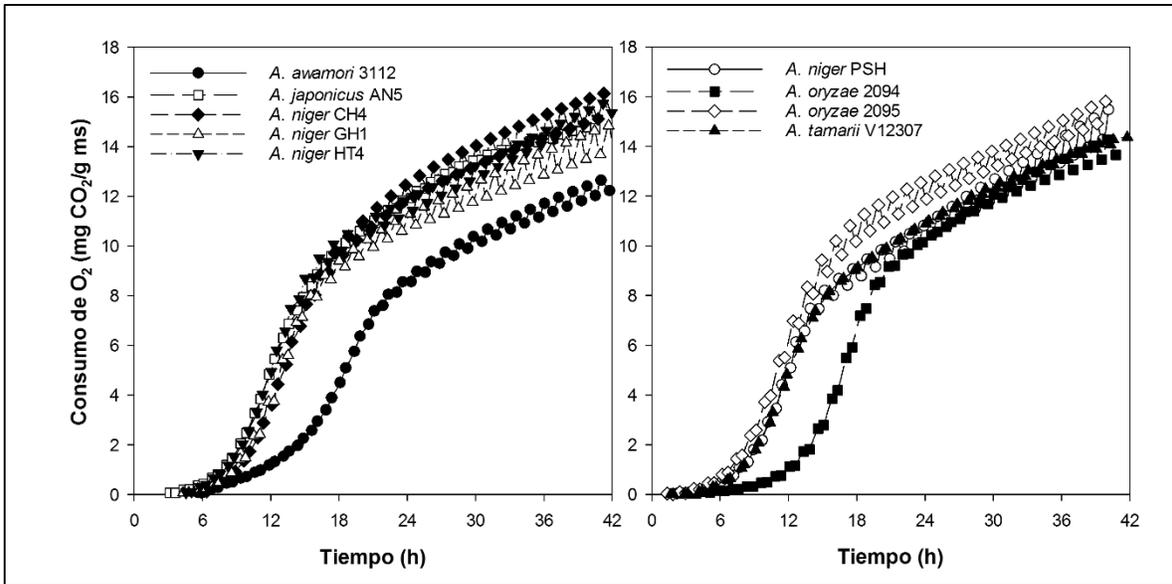


Figura 8.9 Consumo acumulado de O₂ durante la FMS en columnas.

La Tabla 8.5 muestra los parámetros calculados con el modelo de Pirt. Los datos se ajustaron adecuadamente al modelo, con valores de R² superiores a 0.99. Los valores de O₂ acumulado estimados por el modelo fueron cercanos a los observados experimentalmente (de 12.03 a 15.45 mg de O₂/g ms). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el rendimiento respiratorio asociado al crecimiento (Y_{CO_2/O_2}) ni entre el coeficiente de consumo de O₂ no asociado al crecimiento (m_{O_2}) obtenidos para los diferentes microorganismos estudiados. El rendimiento Y_{CO_2/O_2} estimado por el modelo fue menor a uno en todos los casos (0.863-0.970 mmol CO₂/mmol O₂). El coeficiente γ fue significativo en todos los casos y tuvo un valor de 0.013 a 0.025 mmol O₂/mmol CO₂·h. Estos valores indican que el consumo de O₂ es mayor que la producción de CO₂.

Tabla 8.5 Parámetros de consumo de O₂ estimados por el modelo de Pirt

Microorganismo	Y_{CO_2/O_2} * (mmol CO ₂ /mmol O ₂)	m_{O_2} * (mmol O ₂ /mmol CO ₂ ·h)	R ²
<i>A. awamori</i> 3112	0.863 ± 0.010	0.017 ± 0.001	0.9959
<i>A. japonicus</i> AN5	0.911 ± 0.009	0.013 ± 0.001	0.9981
<i>A. niger</i> CH4	0.928 ± 0.021	0.019 ± 0.003	0.9985
<i>A. niger</i> GH1	0.968 ± 0.000	0.015 ± 0.004	0.9970
<i>A. niger</i> HT4	0.970 ± 0.049	0.022 ± 0.000	0.9987
<i>A. niger</i> PSH	0.956 ± 0.014	0.025 ± 0.004	0.9948
<i>A. oryzae</i> 2094	0.897 ± 0.043	0.025 ± 0.011	0.9979
<i>A. oryzae</i> 2095	0.940 ± 0.001	0.019 ± 0.001	0.9976
<i>A. tamarii</i> V12307	0.888 ± 0.035	0.022 ± 0.004	0.9983

* No hay diferencias significativas de acuerdo al ANOVA en rangos (Kruskal-Wallis $\alpha=0.05$)

La Figura 8.10 muestra el coeficiente respiratorio (CR) obtenido para las diferentes cepas del género *Aspergillus* en FMS. Los valores de CR fueron menores a uno en todos los casos. El CR se incrementó continuamente desde el inicio de la fermentación hasta alcanzar su valor máximo (0.82-0.91 mmol CO₂/mmol O₂) y después disminuyó hasta alcanzar un valor de 0.53-0.76 mmol CO₂/mmol O₂ al final de la fermentación. Estos valores indican un consumo de O₂ mayor a la producción de CO₂ (1.3-1.9 veces mayor, en base molar).

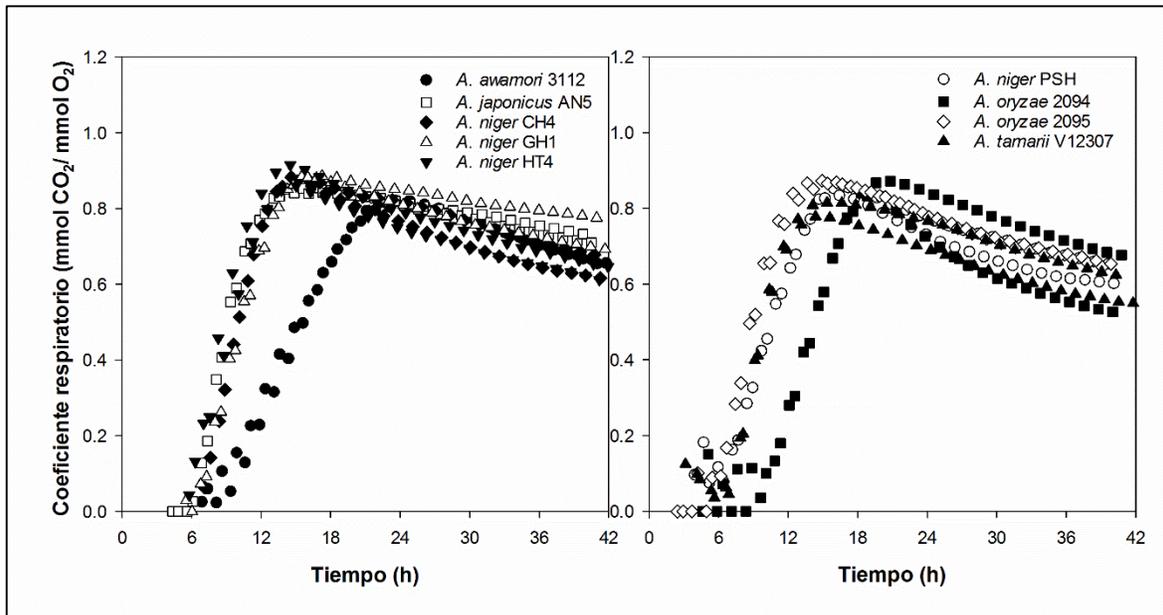


Figura 8.10 Evolución del coeficiente respiratorio (CR) durante la FMS en columnas.

De acuerdo con los parámetros calculados con el modelo de Pirt, al final de la fermentación (40 h) del 60 al 77% del O₂ consumido está asociado al crecimiento, mientras que del 23 al 40% del O₂ consumido está destinado a funciones no asociadas al crecimiento fúngico. El valor del CR depende de la estequiometría de la fermentación. En el caso de respiración aerobia usando azúcares y carbohidratos como sustratos, el CR generalmente es cercano a uno (Rodríguez-Leon *et al.*, 2008). En el presente trabajo se utilizó un sustrato complejo compuesto de azúcares, ácidos fenólicos y otros compuestos no identificados presentes en el extracto de café verde, por lo que no es posible establecer la estequiometría de la fermentación. Valores de CR menores a 1 pueden estar relacionados a la limitación de sustrato (Righelato *et al.*, 1968) a la producción de metabolitos secundarios (Rodríguez-Leon *et al.*, 2008) y a la oxidación de cadena de ácido grasos.

En el anexo 2 se muestran los cambios en la humedad y pH durante la FMS en columnas. La humedad inicial fue de 58-61%. En todos los casos se observó un descenso en la humedad durante la incubación, pero la humedad final fue siempre igual o mayor al 54% (Figura A2.1). Este descenso en la humedad no afectó el crecimiento, ya que la humedad siempre fue superior al punto crítico de humedad (PCH) de la agrolita el cual es del 29% (Mendoza-Ortiz, 2006). El PCH representa la cantidad de agua ligada al soporte, la cual no puede ser utilizada por los microorganismos para sus funciones metabólicas. Cuando la humedad es cercana al PCH, el crecimiento microbiano puede ser afectado (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014).

El pH inicial del medio fue de 6.5 ± 0.2 . En el caso de la FMS con las cepas de *A. awamori*, *A. japonicus* y *A. niger*, se observó un descenso del pH durante las primeras horas (de 0.3 a 1.8 unidades), seguido de un aumento hasta el final de la fermentación (pH final = 6.6-7.25). Para las cepas de *A. tamarisii* y *A. oryzae* se observó un aumento continuo desde el inicio hasta el final de la fermentación (pH final = 8.3-8.4) (Figura A2.3).

Las variaciones del pH durante la fermentación se deben a la actividad metabólica del microorganismo. Las principales causas del descenso del pH son la secreción de ácidos orgánicos (ácido cítrico, acético, láctico, etc.) y el consumo de sales de amonio (Raimbault, 1998). Por otra parte, la alcalinización del medio de cultivo, generalmente está asociado a la liberación de amoníaco como producto de la actividad proteolítica y la descomposición de los aminoácidos (Gombert *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005).

En el anexo 2 también se muestran los perfiles de consumo de ACL, AC, AQ, maltosa y glucosa durante la FMS en columnas (Figuras A2.3-A2.7). Se observó un rápido consumo del ACL en menos de 18 h para todas las cepas. Sólo se observó acumulación importante de AC en el caso de *A. awamori* 3112, probablemente debido a su crecimiento más lento con respecto a las demás cepas. Un comportamiento similar se observó para los perfiles de acumulación de AQ.

Todas las cepas estudiadas consumieron completamente el AQ liberado durante la hidrólisis del ACL, excepto la cepa de *A. japonicus*. En el caso de *A. japonicus* AN5, se observó una concentración de $1.277 \mu \text{mol}$ de AQ por g de ms al final de la FMS. Esta cantidad de AQ corresponde aproximadamente a un rendimiento del 10% con respecto al

ACL consumido. Estos resultados sugieren que el ACL y los productos de su hidrólisis son fuentes de carbono fácilmente asimilables para las especies de *Aspergillus* estudiadas.

Se observó un consumo total de la maltosa para todas las cepas estudiadas. En el caso de la glucosa, sólo se observó el consumo total de glucosa para las cepas de *A. niger* y *A. awamori*. La glucosa residual al final de la FMS con las cepas de *A. japonicus*, *A. oryzae* y *A. tamarii* fue de 0.9 a 3.2 μ mol/g ms. Esto corresponde a un rendimiento molar del 5 al 20% respecto a la maltosa consumida (Figuras A2.6 y A2.7).

Los perfiles de producción de clorogenato hidrolasa en la FMS en columnas mostraron dos tipos de comportamiento (Figura 8.11). Existe un grupo de cepas (*A. awamori*, *A. tamarii* y *A. oryzae*) que alcanzan su mayor actividad durante las 24 h primeras horas de incubación, pero después presentan un descenso rápido de esta actividad. El resto de las cepas alcanzaron su máxima actividad entre las 14 y las 40 h, y esta actividad se mantuvo estable hasta el final de la fermentación. El descenso de la actividad enzimática para las cepas de *A. awamori*, *A. oryzae* y *A. tamarii* puede estar relacionado a la producción de proteasas. Esta hipótesis es apoyada por la alcalinización del medio de cultivo observada para estas cepas. Sin embargo, en este trabajo no se determinó la actividad proteasa.

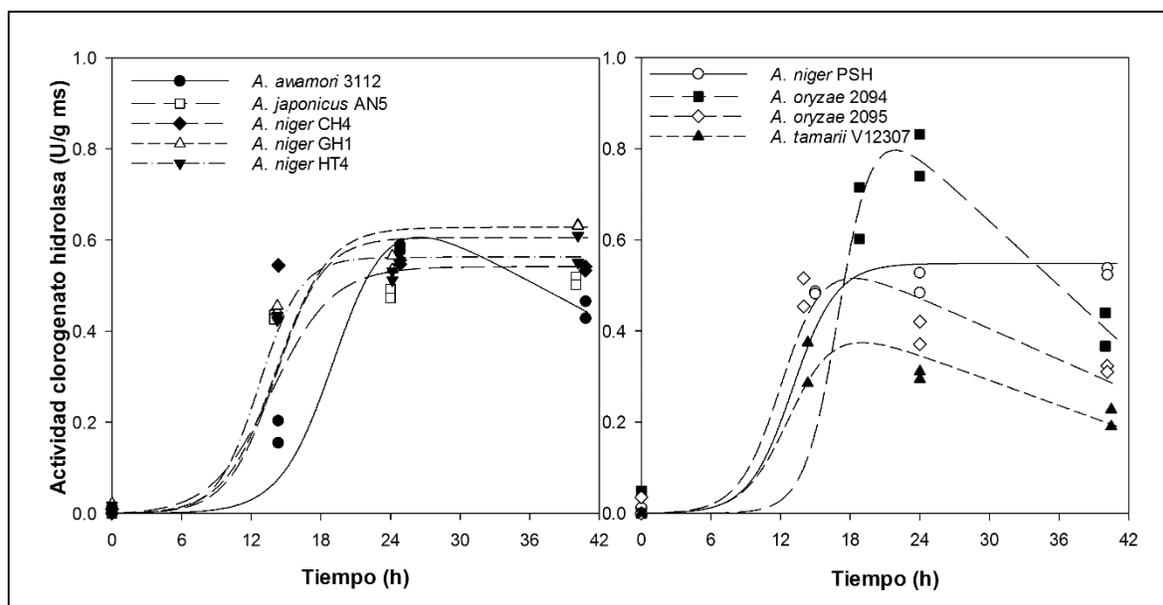


Figura 8.11 Producción de actividad clorogenato hidrolasa durante la FMS en columnas (los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan la producción calculada con el modelo de Luedeking y Piret).

La mayor actividad clorogenato hidrolasa (0.786 ± 0.006 U/g ms) se obtuvo con *A. oryzae* 2094 a las 24 h. Sin embargo, esta actividad decayó a la mitad (0.403 ± 0.045 U/g ms), aproximadamente, a las 40 h. Al final de la FMS, la mayor actividad (0.632 ± 0.003 U/g ms) se obtuvo con la cepa GH1 de *A. niger*. Con esta cepa se obtuvo una actividad de 0.449 ± 0.013 U/g ms a las 24 h, y la actividad enzimática se incrementó continuamente hasta las 40 h.

Los datos de actividad enzimática se ajustaron al modelo de Luedeking y Piret acoplado al modelo logístico de crecimiento estimado a través de la producción de CO₂. (Soto-Cruz *et al.*, 2002) En la Tabla 8.6 se muestran los valores estimados para el parámetro asociado al crecimiento (α) y el parámetro no asociado al crecimiento (β). Se observó un buen ajuste de los datos al modelo, con valores de R² superiores a 0.93 en todos los casos. De acuerdo con un intervalo de confianza del 95%, el parámetro α fue significativo para todos los casos, por lo que la producción de la actividad clorogenato hidrolasa está asociada al crecimiento.

Tabla 8.6 Parámetros calculados para el modelo de Luedeking-Piret

Microorganismo	α (U/mg CO ₂)	β (U/mg CO ₂ ·h)	R ²
<i>A. awamori</i> 3112	0.067 ± 0.016	-0.0012 ± 0.0010	0.9792
<i>A. japonicus</i> AN5	0.038 ± 0.007	$0.0000 \pm 0.0000^*$	0.9613
<i>A. niger</i> CH4	0.045 ± 0.011	$0.0000 \pm 0.0000^*$	0.9343
<i>A. niger</i> GH1	0.047 ± 0.007	$0.0000 \pm 0.0000^*$	0.9755
<i>A. niger</i> HT4	0.044 ± 0.003	$0.0000 \pm 0.0000^*$	0.9950
<i>A. niger</i> PSH	0.047 ± 0.005	$0.0000 \pm 0.0000^*$	0.9885
<i>A. oryzae</i> 2094	0.083 ± 0.009	-0.0021 ± 0.0006	0.9933
<i>A. oryzae</i> 2095	0.045 ± 0.011	-0.0008 ± 0.0005	0.9730
<i>A. tamaraii</i> V12307	0.040 ± 0.009	-0.0008 ± 0.0005	0.9748

*Parámetros no significativos de acuerdo con el intervalo de confianza (95%)

El parámetro α corresponde al rendimiento de producto por CO₂ (Y_{P/CO₂}). En este caso se utilizó la respirometría para estimar de manera indirecta el crecimiento, por lo que el parámetro α se calculó en términos de U por mg de CO₂ producido. El valor más bajo calculado para el parámetro α fue de 0.040 U/mg CO₂, para *A. tamaraii* V12307 y el más alto fue de 0.083 U/mg CO₂, para *A. oryzae* 2094. Esto quiere decir que, si el CO₂ producido es

directamente proporcional a la cantidad de biomasa, la cepa 2094 de *A. oryzae* produce más el doble de actividad por g de biomasa que la cepa V12307 de *A. tamaritii*.

El parámetro no asociado al crecimiento (β) calculado para las cepas de *A. japonicus* y *A. niger* fue despreciable. El intervalo de confianza de estos parámetros incluyó el valor cero, por lo que estos parámetros fueron removidos del modelo sin afectar el ajuste (Soto-Cruz *et al.*, 2002). En el caso de las cepas de *A. awamori*, *A. oryzae* y *A. tamaritii*, el parámetro β fue significativo, pero menor a cero. Los valores negativos del parámetro β pueden estar relacionados con una tasa de decaimiento en la actividad clorogenato hidrolasa, la cual no está presente en los cultivos con las cepas de *A. niger* y *A. japonicus* (Aguilar *et al.*, 2001).

El decaimiento en la actividad enzimática al final del cultivo puede estar relacionado con diferentes factores, como la estabilidad de la enzima o la actividad proteolítica. Las fermentaciones se llevaron a cabo a 30°C, por lo que la desactivación térmica de la enzima es poco probable. La alcalinización del medio de cultivo durante la FMS con las cepas de *A. oryzae*, *A. tamaritii* y, en menor medida para *A. awamori*, coincide con los valores negativos del parámetro β . La alcalinización del medio de cultivo está frecuentemente asociado a la actividad proteolítica (Gombert *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005), por lo que el decaimiento en la actividad clorogenato hidrolasa puede estar asociado a la presencia de proteasas. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis es necesario cuantificar la actividad proteasa durante la FMS.

8.5 Conclusiones

La estrategia experimental utilizada nos permitió identificar cepas microbianas capaces de producir enzimas con actividad clorogenato hidrolasa en un sistema de FMS. Sin embargo, los resultados obtenidos no nos permitieron seleccionar una cepa para la producción de esta enzima. Las 10 cepas microbianas evaluadas fueron capaces de crecer en un medio de cultivo sólido con ACL como fuente de carbono, pero sólo las cepas del género *Aspergillus* fueron capaces de producir halos de hidrólisis de ACL. Los experimentos de FMS en micro-escala confirmaron que sólo las cepas del género *Aspergillus* son capaces de producir cantidades considerables de actividad clorogenato hidrolasa.

Se observaron diferencias en los perfiles de crecimiento, producción de CO₂, consumo de ACL, acumulación de productos de la hidrólisis del ACL y producción de actividad clorogenato hidrolasa durante la FMS con las diferentes cepas fúngicas. Por ejemplo, la mayor actividad clorogenato hidrolasa (0.786 ± 0.006 U/g ms) se obtuvo con *A. oryzae* 2094 a las 24 h. Sin embargo, esta actividad disminuyó casi a la mitad (0.403 ± 0.045 U/g ms) a las 40 h de incubación. Al final de la FMS, la mayor actividad (0.632 ± 0.003 U/g ms) se obtuvo con la cepa GH1 de *A. niger*.

Los parámetros calculados con el modelo de Luedeking-Piret mostraron dos grupos de microorganismos. En el primero (cepas de *A. japonicus* y *A. niger*) el parámetro β fue despreciable, por lo que la producción de la actividad clorogenato hidrolasa es completamente asociada al crecimiento. En el segundo grupo (cepas de *A. awamori*, *A. oryzae* y *A. tamarii*) el parámetro β fue negativo, lo que indica un decaimiento de la actividad enzimática. Este decaimiento coincide con la alcalinización del medio de cultivo, y puede estar asociado a la actividad proteolítica. Sin embargo, en este trabajo no se determinó la actividad proteasa.

Para fines comerciales y de investigación, la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por cepas de *A. japonicus* y *A. niger* es más conveniente que las cepas de *A. awamori*, *A. oryzae* y *A. tamarii*, debido a los patrones de actividad enzimática durante la FMS.

9. Síntesis enzimática de CAPE

9.1 Resumen

El ester fenético del ácido cafeico (CAPE) es el principal compuesto activo presente en el propóleo y tiene numerosas actividades biológicas (antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, carcinostática, entre otras). Debido a estas propiedades, el CAPE tiene aplicaciones potenciales en medicina y cosmetología. En este capítulo se desarrolló un método para la síntesis enzimática de CAPE.

Se estudiaron las reacciones de esterificación entre AC y 2-FE y de transesterificación entre ACL y 2-FE catalizada por enzimas comerciales (lipasas, y enzimas con actividad clorogenato hidrolasa) en disolventes orgánicos y en una microemulsión agua-AOT-isooctano. Se modelaron las cinéticas de producción de CAPE para todos los casos estudiados.

La lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada (Novozym® 435) fue capaz de catalizar la síntesis de CAPE mediante esterificación entre AC y 2-FE con un rendimiento alto ($88.74 \pm 8.57\%$) usando isooctano como disolvente. Pero el rendimiento de la transesterificación entre ACL y CAPE fue bajo ($0.91 \pm 0.30\%$). El uso de disolventes o cosolventes más polares que el isooctano mejoró la solubilidad del AC, pero no mejoró la tasa de reacción ni la conversión o el rendimiento final. Una pectinasa liofilizada de *A. niger* con actividad clorogenato hidrolasa fue incapaz de catalizar la síntesis de CAPE por reacciones de esterificación o transesterificación usando isooctano como disolvente.

En el sistema de microemulsión agua-AOT-isooctano, la lipasa libre de *C. antarctica* (Lipozyme® CALB) catalizó la reacción de esterificación entre AC y 2-FE y la reacción de transesterificación entre ACL y 2-FE aproximadamente con la misma constante de reacción de primer orden ($k = 0.002 \text{ h}^{-1}$). Mientras que una hemicelulasa comercial (Novozyme NS22002) con actividad clorogenato hidrolasa catalizó las reacciones de esterificación y transesterificación con constantes de reacción (k) 12 y 350 veces mayor que la lipasa (0.025 y 0.766 h^{-1} , respectivamente). Se evaluó el efecto de la temperatura, el pH, la relación molar agua/surfactante (w_0) y la concentración del surfactante sobre la síntesis de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE catalizada por la enzima comercial NS22002.

Finalmente se utilizaron extractos enzimáticos con actividad clorogenato hidrolasa producidos por hongos filamentosos en un sistema de FMS para catalizar la síntesis enzimática de CAPE en el sistema de microemulsión estudiado previamente. El modelamiento de las reacciones de síntesis y estimación de los parámetros cinéticos permitió realizar una comparación objetiva entre los resultados obtenidos con los diferentes extractos utilizados.

De acuerdo con los perfiles de producción de la enzima, las constantes de reacción, la conversión y rendimientos obtenidos se seleccionó el extracto enzimático producido por *A. japonicus* AN5 para la síntesis de CAPE. El extracto se concentró hasta una actividad clorogenato hidrolasa de 13.1 U/mL y se usó para catalizar la síntesis de CAPE usando ACL como sustrato así como extractos ricos en ACL obtenidos de la PC. En ambos casos se obtuvo una alta conversión (mayor al 97%) con un rendimiento del 34-37% en un tiempo de reacción de 12 h.

9.2 Introducción

El CAPE es uno de los principales compuestos activos presentes en el propóleo. El CAPE tiene actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, inmunomoduladora, antiangiogénica, anti-invasiva, anti-metastásico, carcinostática, neuroprotectora, hepatoprotectora y cardioprotectora (Tolba *et al.*, 2013).

Debido a sus actividades biológicas, el CAPE tiene aplicaciones potenciales en medicina y cosmetología. Los usos del CAPE incluyen: tratamiento de cáncer (Koumenis y Naczki, 2004; Stonans *et al.*, 2011; Kalvins *et al.*, 2012), de desórdenes neurodegenerativos y cardiovasculares (Du, 2015), agente antiviral contra el VIH y el virus de la influenza (Yang, 2002; Noriaki y Tokio, 2004), y como ingrediente activo en productos para el cuidado de la piel (Yasuhiro, 2009), la prevención de la obesidad (Shin *et al.*, 2012) y la regulación del crecimiento del cabello (Henry *et al.*, 2008).

Actualmente, el CAPE se extrae de fuentes naturales, como el propóleo (un producto de las abejas). El proceso de extracción es sencillo y económico. Sin embargo, estas materias primas son limitadas y costosas. Además, la recuperación y purificación del CAPE a partir de fuentes naturales es complicado y lento (Ye *et al.*, 2012).

Se han descrito varios métodos para la síntesis química o enzimática del CAPE. Sin embargo, estos métodos tienen algunos inconvenientes. Los métodos químicos requieren de largos tiempos de preparación (hasta 96 h), algunos requieren de pasos intermedios de síntesis y purificación. Además, estos métodos utilizan reactivos, catalizadores y solventes tóxicos y peligrosos.

Por otra parte, la síntesis enzimática de CAPE reduce el uso de compuestos tóxicos y algunos métodos enzimáticos conducen a altos rendimientos (mayores al 90%). Sin embargo, estos métodos tienen algunos inconvenientes, como los largos tiempos de reacción (48-60 h) y las grandes cantidades de biocatalizador necesarias (15-18 mg de catalizador/mg de AC) (Zhang *et al.*, 2014). Esto puede estar asociado a la baja afinidad entre el biocatalizador y los sustratos utilizados, así como a la baja solubilidad de los mismos.

En el presente trabajo se desarrolló un método para la síntesis enzimática de CAPE usando enzimas con actividad clorogenato hidrolasa como catalizador y una emulsión agua en aceite como medio de reacción. Las microemulsiones permiten solubilizar sustratos de diferente polaridad y mantener un medio de reacción con baja actividad acuosa.

9.3 Materiales y métodos

9.3.1 Materiales

Las enzimas utilizadas se obtuvieron de casas comerciales especializadas y se usaron sin ningún tratamiento previo. La pectinasa de *A. niger* se obtuvo de Sigma Aldrich, (St. Louis, USA), las preparaciones multi-enzimáticas NS22002, NS22035, NS22083, NS22086, NS22118 y NS22119 fueron adquiridas de Novozymes A/S (Bagsværd, Dinamarca). Las lipasas de *C. antarctica*, *R. miehei* y *T. lanuginosus* son productos de Novozymes A/S, pero fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich.

Los extractos enzimáticos crudos utilizados para la síntesis de CAPE fueron producidos por hongos del género *Aspergillus* en un sistema de FMS, como se describió en el capítulo 8. Los extractos crudos fueron filtrados a través de membranas de celulosa regenerada de 0.2 µm de poro y concentrados aproximadamente 100 veces por ultrafiltración usando tubos Amicon® con tamaño de corte de 10 kDa. Los extractos concentrados se diluyeron con buffer de fosfatos (50 mM, pH 6.5) para ajustar la actividad a 1.7 U/mL.

El extracto rico en ACL se obtuvo por EAM de la PC como se describió en el capítulo 7: La PC seca y molida (tamaño de partícula = 0.15-0.84 mm) se sometió a una extracción en microondas con etanol al 50% durante 4 min a 50 °C. El extracto obtenido se fraccionó en una columna empacada con amberlita XAD-16 y por HPLC semi-preparativo usando una columna C18. La fracción rica en ACL se evaporó para obtener un extracto rico en ACL con una pureza del 61.7% (p/p).

9.3.2 Estrategia experimental

Se estudió la síntesis enzimática de CAPE usando dos tipos de medios de reacción (disolventes orgánicos y microemulsiones) y dos tipos de enzimas (lipasas y clorogenato hidrolasas) mediante esterificación entre AC y 2-FE y transesterificación entre ACL y 2-FE.

Para la síntesis de CAPE en disolventes orgánicos se utilizaron preparaciones enzimáticas sólidas, mientras que para la síntesis en microemulsiones se usaron preparaciones enzimáticas líquidas. En ambos sistemas se usó lipasa B de *C. antarctica*, ya que es la lipasa más utilizada para la síntesis de ésteres AC (Widjaja *et al.*, 2008; Olguín-Gutiérrez, 2010). En cuanto a las enzimas con actividad clorogenato hidrolasa, se evaluó la actividad enzimática de 11 preparaciones comerciales. Las preparaciones con mayor actividad enzimática se utilizaron para la síntesis de CAPE.

Se estudió el efecto de las condiciones de reacción en ambos sistemas. El sistema más eficiente se usó para la síntesis de CAPE con extractos enzimáticos producidos en FMS como catalizadores y extractos de PC ricos en ACL como sustrato. En la Figura 9.1 se muestra un esquema de la estrategia experimental utilizada.

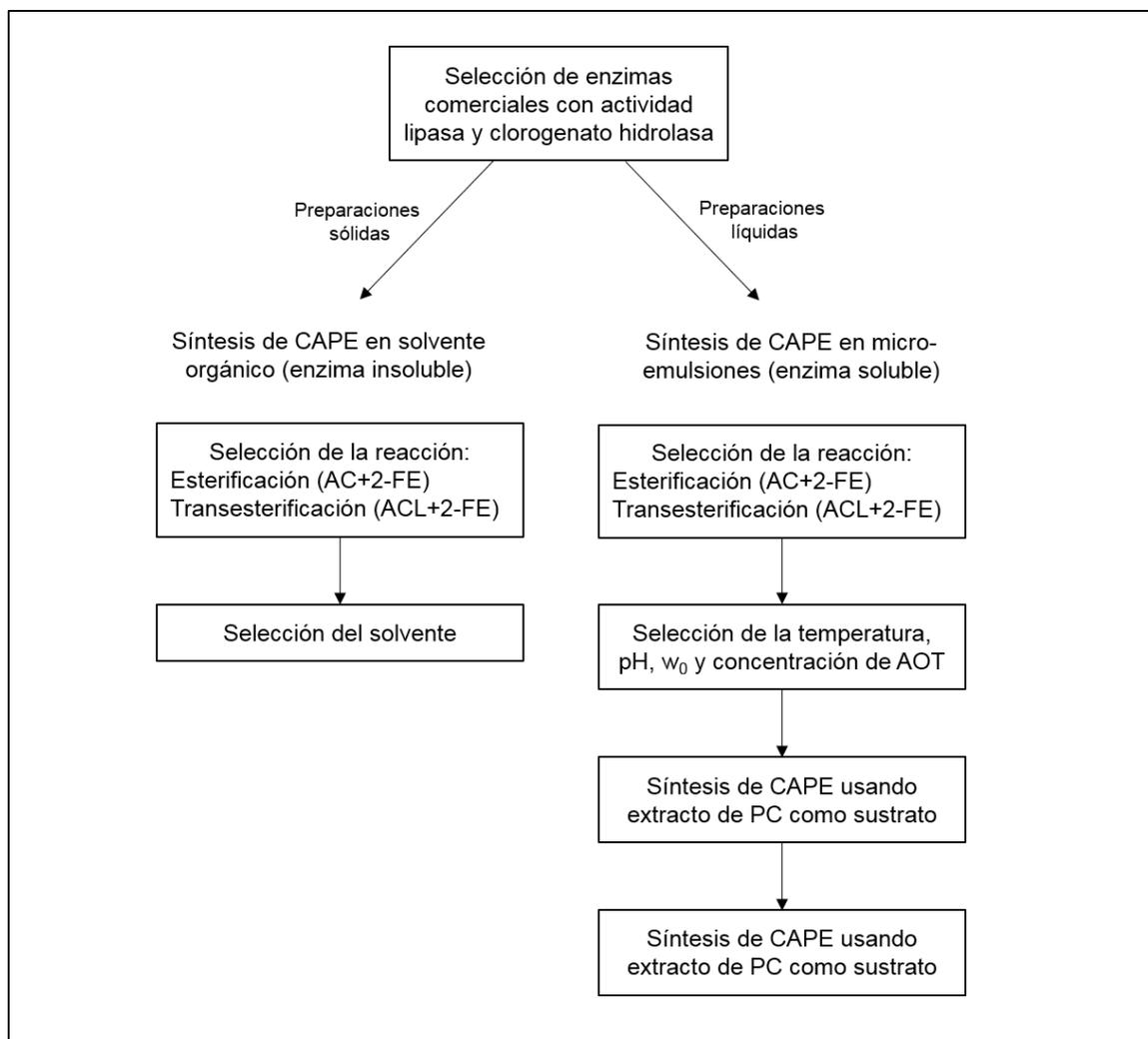


Figura 9.1 Estrategia experimental utilizada para la síntesis enzimática de CAPE.

9.3.3 Selección de enzimas comerciales para la síntesis de CAPE

Se evaluó la actividad clorogenato hidrolasa de 11 preparaciones enzimáticas comerciales (9 líquidas y 2 sólidas). Se evaluaron 2 pectinasas, 3 lipasas y 6 preparaciones multienzimáticas con actividad celulasa o hemicelulasa.

La actividad clorogenato hidrolasa de las enzimas comerciales y de los extractos enzimáticos crudos se determinó por el método descrito en el capítulo 8: se colocaron 900 μL de ACL 5 mM en buffer de fosfatos (50 mM, pH 6.5). Se agregaron 100 μL de extracto enzimático y se incubó durante 30 min a 37 °C. La reacción se detuvo agregando 1 mL de metanol. La mezcla de reacción se filtró a través de membranas de celulosa regenerada de

0.2 μm de poro y se inyectó a un equipo de HPLC para cuantificar la liberación de AC durante la reacción enzimática.

9.3.4 Síntesis enzimática de CAPE en disolventes orgánicos

Se estudió la síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación en solventes orgánicos. Para este estudio se utilizó una lipasa inmovilizada de *C. antarctica* (Novozym® 435) con una actividad de 5000 PLU/g y una pectinasa liofilizada de *A. niger* (Sigma 17389), la cual tiene una actividad clorogenato hidrolasa de 0.7 U/g.

Se pesaron 2 mg de AC o 4 mg de ACL en viales ámbar de 8 mL con tapa de rosca, se agregaron 125 mg de 2-FE, 42 mg de enzima y 3 mL de isooctano. Los viales se cerraron herméticamente y se incubaron a 60 °C en baño de aceite con agitación magnética. La reacción se detuvo añadiendo 3 mL de acetona y agitando en vórtex por 10 segundos. Se tomaron 100 μL de esta mezcla y se colocaron en microtubos de 2 mL. Las muestras se evaporaron a 40 °C en un horno al vacío y se disolvieron en 1 mL de metanol. Se filtraron a través de membranas de celulosa regenerada de 0.2 μm y se analizaron por HPLC.

Se evaluó el uso de cosolventes (acetona y tetrahidrofurano) a una concentración del 10% (v/v) así como el uso de un solvente más polar que el isooctano (*tert*-butanol) solo o en presencia de cosolventes (DMF y DMSO) al 10% (v/v). Las reacciones estudiadas para la síntesis de CAPE se muestran en la Figura 9.2.

9.3.5 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones

Se estudió la síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación en una microemulsión agua-AOT-isooctano. Para esta sección se utilizó una lipasa de *C. antarctica* (Lipozyme® CALB) con una actividad de 5000 U/g y una hemicelulasa de *Humicola insolens* (Novozymes NS22002), la cual tiene actividad clorogenato hidrolasa de 17.7 U/mL.

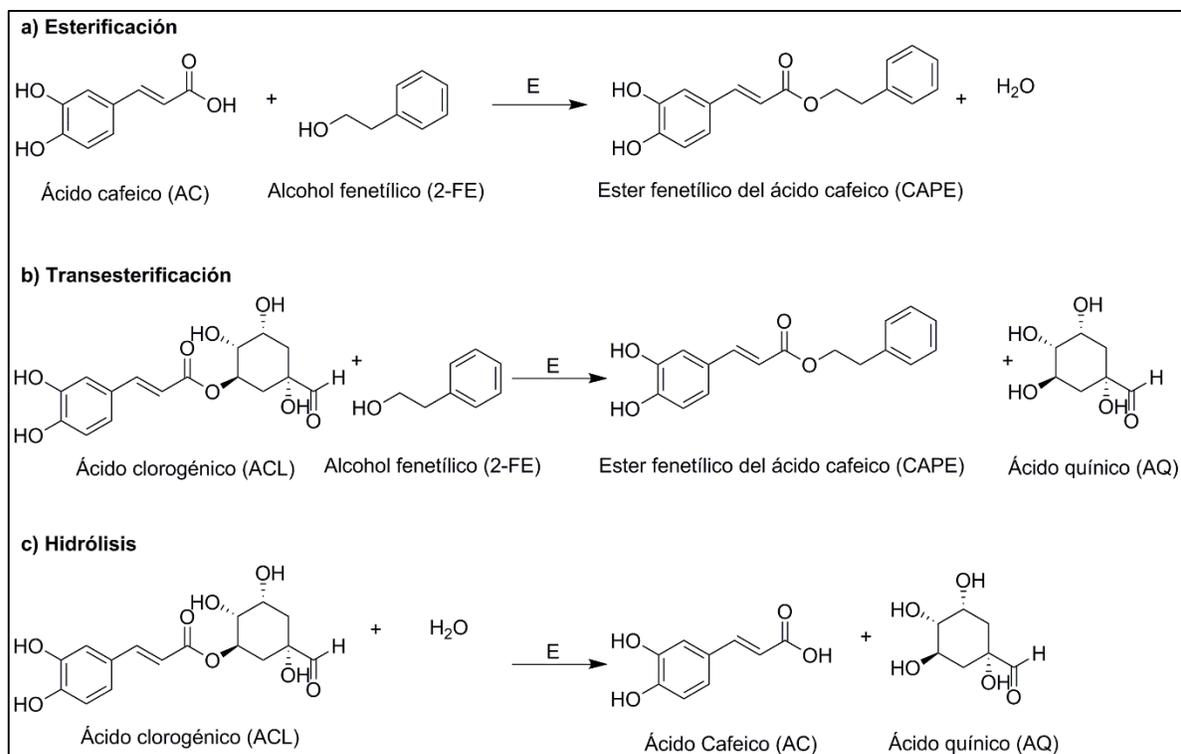


Figura 9.2 Reacciones estudiadas para la síntesis enzimática de CAPE

Se preparó una solución madre (stock) de 2-FE (100 mM) y AOT (100 mM) en isooctano, la cual se conservó en refrigeración hasta su uso. Se colocaron 4 mL de la solución stock en viales ámbar de 8 mL, se agregaron 50 μ L de una solución 20 mM de AC o ACL en buffer de fosfatos (50 mM, pH 6.0). Se agitó en vórtex durante 30 s y se dejó reposar la mezcla durante 10 min. Se agregaron 20 μ L de enzima comercial, se agitó en vortex 30 s y se incubó a 50 °C en baño de aceite con agitación magnética. Se tomaron muestras de 100 μ L a intervalos regulares, las cuales se mezclaron con 100 μ L de acetona para detener la reacción. Las muestras se evaporaron a 40 °C en un horno al vacío, se disolvieron en 1 mL de metanol, se filtraron a través de membranas de celulosa regenerada de 0.2 μ m y se analizaron por HPLC.

Se evaluó el efecto de la temperatura (30-70 °C), pH (4-7), la relación molar agua/surfactante w_0 (5-20) y la concentración de surfactante (AOT, 100-400 mM) sobre la constante de reacción, la conversión y rendimiento de las reacciones de síntesis de CAPE.

9.3.6 Análisis de los sustratos y productos

La cuantificación de los sustratos y productos (AC, ACL y CAPE) se hizo mediante un método cromatográfico. La separación se llevó a cabo en un equipo de HPLC Shimadzu Prominence descrito anteriormente (sección 6.30.4) y una columna Restek Ultra C18 (150 x 3.2 mm). Se utilizó un método isocrático, con una fase móvil compuesta por acetonitrilo (40 %), ácido acético (0.24 %) y agua (59.76 %) a un flujo de 0.5 mL/min. La detección se hizo a 320 nm. Se construyeron curvas patrón de cada uno de los estándares en concentraciones de 0.002 a 0.5 mg/mL.

9.3.7 Expresión de resultados

El consumo de sustrato se expresó en términos de conversión x 100 ($X_{AC} \times 100$; $X_{ACL} \times 100$). La producción de CAPE se expresó en términos de rendimiento x 100 ($Y_{CAPE} \times 100$) y concentración molar (m moles de CAPE/L de solución).

La conversión se define como la fracción de un reactivo que se transforma en otro compuesto, o la fracción del reactivo que ha reaccionado:

$$X_{AC} = \frac{AC_0 - AC}{AC_0}; X_{ACL} = \frac{ACL_0 - ACL}{ACL_0} \quad \text{Ecuación 9.1}$$

En donde AC y ACL son concentración de AC y ACL al tiempo en el que se calculó la conversión; AC_0 y ACL_0 son las concentraciones de AC y ACL al inicio de la reacción. El rendimiento se definió como la fracción del sustrato consumido que se transformó en el producto deseado:

$$Y_{CAPE} = \frac{CAPE}{AC_0 - AC}; Y_{CAPE} = \frac{CAPE}{ACL_0 - ACL} \quad \text{Ecuación 9.2}$$

En donde $CAPE$ es la concentración de CAPE en el tiempo al que se calculó el rendimiento (Y_{CAPE}).

9.4 Elementos teóricos del modelamiento de la síntesis de CAPE

De acuerdo a la evidencia experimental encontrada se proponen ecuaciones para simular la síntesis de CAPE que serán validadas por comparación con los datos

experimentales obtenidos, el detalle del desarrollo de los modelos se encuentra en el Anexo 2. Los modelos propuestos corresponden a tres mecanismos elementales de reacción:

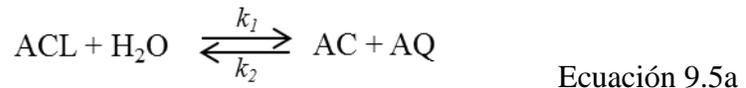
1) Reacción de esterificación:



2) Reacciones de transesterificación e hidrólisis simultáneas:



3) Reacciones de hidrólisis y esterificación consecutivas:



Para los tres casos propuestos se hicieron las siguientes consideraciones:

- Las reacciones estudiadas se pueden considerar como mecanismos elementales.
- Las reacciones de esterificación y transesterificación estudiadas para la síntesis de CAPE son bimoleculares, ya que intervienen dos moléculas como sustratos.
- En las condiciones evaluadas la concentración del 2-FE fue mucho mayor que la del sustrato limitante, por lo que la concentración del sustrato en exceso es prácticamente constante durante la reacción. En estas condiciones, la tasa de reacción es proporcional a la concentración del sustrato limitante.
- Las reacciones de los incisos 2 y 3 se consideraron reversibles.

9.4.1 Formación de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE

La esterificación entre AC y 2-FE se llevó a cabo a una concentración de 2-FE mucho mayor a la concentración del AC. En estas condiciones, la tasa de reacción depende de la concentración del sustrato limitante (AC). Para fines cuantitativos, la ecuación 9.3 puede simplificarse de la siguiente forma:



La tasa de producción de CAPE (o de consumo de AC), se puede expresarse de la siguiente manera:

$$\frac{dCAPE}{dt} = -\frac{dAC}{dt} = k_1 AC \quad \text{Ecuación 9.7}$$

Para la estimación de parámetros se compararon los datos experimentales y los calculados usando dos metodologías. La primera estima las constantes por técnicas clásicas de la ingeniería de reacciones basada en regresiones lineales (Método 1) y la segunda que combina técnicas de estimación de parámetros usando métodos numéricos de integración y de estimación de parámetros (Método 2).

Método 1. Técnicas clásicas de la ingeniería de reacciones

El primer método, las constantes de reacción se calcularon por técnicas de regresión lineal usando la forma integral de la ecuación 9.7.

Si consideramos una conversión equimolar de AC a CAPE, en cualquier momento de la reacción la suma de la concentración molar de CAPE y la concentración de AC es igual a la concentración inicial de AC ($CAPE + AC = AC_0$), entonces se llega a:

$$\frac{dCAPE}{dt} = k_1 (AC_0 - CAPE) \quad \text{Ecuación 9.8}$$

Cuya forma integrada es:

$$\text{Ln} \left[\frac{AC_0}{AC_0 - CAPE} \right] = k_1 t \quad \text{Ecuación 9.9}$$

La constante de reacción aparente de primer orden (k_1) se estimó a través de la pendiente de la regresión lineal con los datos experimentales de sustrato y producto, usando la ecuación 9.9.

Método 2. Métodos numéricos de integración y de estimación de parámetros

En el segundo método se recurrió a métodos numéricos de integración y estimación de parámetros que minimizan la sumatoria del cuadro del error entre los datos calculados y observados; para este propósito se usó el programa Berkeley-Madonna.

Primero, las variables ACL, AC y CAPE se adimensionalizaron, como se muestra a continuación:

$$AC_{Ad} = \frac{AC - AC_{Min}}{AC_{Max} - AC_{Min}} \quad \text{Ecuación 9.10}$$

$$CAPE_{Ad} = \frac{CAPE - CAPE_{Min}}{CAPE_{Max} - CAPE_{Min}} \quad \text{Ecuación 9.11}$$

Las ecuaciones diferenciales (9.7 y 9.8) se modificaron para incluir las variables adimensionales:

$$\frac{dAC_{Ad}}{dt} = -k_1 \frac{AC_{Ad} (AC_{Max} - AC_{Min}) + AC_{Min}}{(AC_{Max} - AC_{Min})} \quad \text{Ecuación 9.12}$$

$$\frac{dCAPE_{Ad}}{dt} = -k_1 \frac{AC_{Ad} (CAPE_{Max} - CAPE_{Min}) + CAPE_{Min}}{(CAPE_{Max} - CAPE_{Min})} \quad \text{Ecuación 9.13}$$

Las constantes de reacción involucradas se estimaron por ajuste simultáneo de las dos ecuaciones diferenciales adimensionalizadas (ecuaciones 9.12 y 9.13), esto disminuye el sesgo en la estimación de los parámetros involucrados, es decir, cada variable es igualmente ponderada en la minimización de suma de cuadrados del error. El sistema de ecuaciones se resolvió mediante el método Runge-Kutta de 4° orden. Los parámetros se ajustaron con un algoritmo que minimiza los cuadrados del error entre los valores calculados y los observados. Ambos métodos numéricos se realizaron simultáneamente usando el software Berkeley-Madonna. Mediante la simulación de la reacción se obtuvieron los parámetros (k_1 , AC_0 y

CAPE₀), así como los valores adimensionales calculados para AC y CAPE. Estos valores se utilizaron para calcular la concentración de sustrato y productos reales a través del tiempo.

La estimación de parámetros por métodos numéricos (Método 2) presentó algunas ventajas sobre el uso de las técnicas clásicas de ingeniería de reacciones (Método 1). El uso de métodos numéricos permitió estimar los parámetros considerando simultáneamente los datos experimentales de sustrato y producto. Además, la adimensionalización de los valores experimentales disminuyó el sesgo en la estimación de los parámetros. Esto resultó en un mejor ajuste entre los datos experimentales y los datos calculados por el modelo.

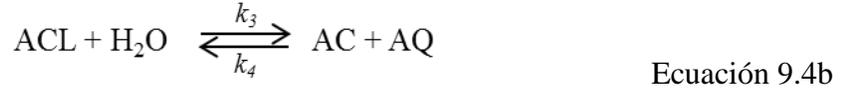
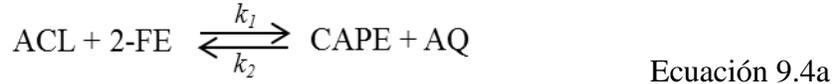
9.4.2 Formación de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE

Durante la reacción de transesterificación entre el ACL y el 2-FE, la evidencia experimental indicó dos patrones diferentes de consumo de sustrato y acumulación de producto. Estos patrones dependen de la enzima utilizada. De acuerdo a los datos experimentales observados se propusieron dos esquemas de reacción, los cuales se describan más adelante.

Debido a las ventajas observadas de la estimación de parámetros por métodos numéricos sobre los métodos clásicos de regresión, los parámetros cinéticos de la síntesis de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE se estimaron solamente por el método 2. Además, resolver analíticamente las ecuaciones cinéticas que describen las reacciones reversibles en serie o paralelo es complicado (Levenspiel, 2004).

Esquema 1. Reacciones en paralelo

Durante la reacción de transesterificación entre el ACL y el 2-FE usando la enzima comercial NS22002 como catalizador, se observó que el ACL se consumió hasta alcanzar una concentración final (ACL_{Eq}). Después de alcanzar esta concentración no se observó consumo de sustrato ni formación de producto. Este patrón es característico de las reacciones reversibles. Además, se observó la formación simultánea de AC y CAPE. Esto puede ser debido a que el consumo de sustrato (ACL) se debe a la suma de dos reacciones (hidrólisis y transesterificación). Este comportamiento es característico de las reacciones en paralelo. Por lo anterior, para modelar el consumo de ACL se propuso el siguiente esquema de reacción:



Este esquema de reacción corresponde a un sistema de dos reacciones paralelas reversibles. En las condiciones estudiadas, la concentración de 2-FE y H₂O es mucho mayor a la del reactivo limitante (ACL). En estas condiciones, la tasa reacción depende de la concentración del sustrato limitante (ACL) y los productos (CAPE y AC). Para fines cuantitativos las ecuaciones 9.4a y 9.4b pueden simplificarse de la siguiente manera:



El consumo de ACL y la formación de CAPE y AC pueden ser descritos por las siguientes ecuaciones:

$$-\frac{dACL}{dt} = (k_1 + k_3)ACL - k_2CAPE - k_4AC \quad \text{Ecuación 9.14}$$

$$\frac{dCAPE}{dt} = k_1ACL - k_2CAPE \quad \text{Ecuación 9.15}$$

$$\frac{dAC}{dt} = k_3ACL - k_4AC \quad \text{Ecuación 9.16}$$

Los valores experimentales se adimensionalizaron, como en las ecuaciones 9.10 y 9.11. Las ecuaciones 9.14-9.16 se modificaron para incluir las variables adimensionales:

$$\begin{aligned} - (ACL_{Max} - ACL_{Min}) \frac{dACL_{Ad}}{dt} &= (k_1 + k_3) [ACL_{Ad} (ACL_{Max} - ACL_{Min}) + ACL_{Min}] \\ &\quad - k_2 [CAPE_{Ad} (CAPE_{Max} - CAPE_{Min}) + CAPE_{Min}] \\ &\quad - k_4 [AC_{Ad} (AC_{Max} - AC_{Min}) + AC_{Min}] \end{aligned} \quad \text{Ec. 9.17}$$

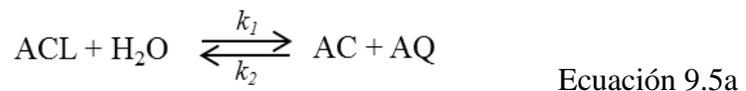
$$\begin{aligned} (CAPE_{Max} - CAPE_{Min}) \frac{dCAPE_{Ad}}{dt} &= k_1 [ACL_{Ad} (ACL_{Max} - ACL_{Min}) + ACL_{Min}] \\ &\quad - k_2 [CAPE_{Ad} (CAPE_{Max} - CAPE_{Min}) + CAPE_{Min}] \end{aligned} \quad \text{Ec. 9.18}$$

$$\begin{aligned} (AC_{Max} - AC_{Min}) \frac{dAC_{Ad}}{dt} = & k_3 [ACL_{Ad} (ACL_{Max} - ACL_{Min}) + ACL_{Min}] \\ & - k_4 [AC_{Ad} (AC_{Max} - AC_{Min}) + AC_{Min}] \end{aligned} \quad \text{Ec. 9.19}$$

Las constantes de reacción se estimaron por ajuste simultáneo de las ecuaciones diferenciales adimensionalizadas (9.17-9-19) usando el software Berkeley-Madonna como se describió anteriormente. Mediante la simulación de ambas reacciones (hidrólisis y transesterificación) se obtuvieron los valores adimensionales calculados para ACL, AC y CAPE. Estos valores se utilizaron para calcular la concentración de sustrato y productos reales a través del tiempo.

Esquema 2. Reacciones en serie

Durante la reacción de transesterificación entre el ACL y el 2-FE por extractos enzimáticos crudos producidos en FMS, se observaron perfiles de producción de CAPE y AC diferentes a los observados para la misma reacción catalizada por la enzima comercial. En el caso de los extractos crudos se observó una rápida acumulación de AC seguida de un consumo del mismo y la acumulación (mucho más lenta) de CAPE. Este comportamiento es característico de los sistemas de reacciones en serie. Además, se observó que la producción de CAPE se detiene antes del consumo total del AC aun en presencia de un exceso de 2-FE. Esto sugiere que la reacción de síntesis de CAPE puede ser reversible. De acuerdo con estas observaciones, se propuso el siguiente esquema de reacción:



Este esquema de reacción corresponde a un sistema de dos reacciones reversibles en serie. En las condiciones estudiadas, la concentración de 2-FE y H₂O es mucho mayor a la del reactivo limitante (ACL). En estas condiciones, la tasa reacción depende de la concentración del sustrato limitante (ACL) y los productos (CAPE y AC). Para fines cuantitativos las ecuaciones 9.5a y 9.5b pueden simplificarse de la siguiente manera:



El consumo de ACL y la formación de CAPE y AC pueden ser descritos por las siguientes ecuaciones:

$$-\frac{dACL}{dt} = k_1 ACL - k_2 AC \quad \text{Ecuación 9.21}$$

$$\frac{dCAPE}{dt} = k_3 AC - k_4 CAPE \quad \text{Ecuación 9.22}$$

$$\frac{dAC}{dt} = k_1 ACL - (k_2 + k_3) AC + k_4 CAPE \quad \text{Ecuación 9.23}$$

Los valores experimentales se adimensionalizaron, como en las ecuaciones 9.10 y 9.11. Las ecuaciones 9.21-9.23 se modificaron para incluir las variables adimensionales:

$$-(ACL_{Max} - ACL_{Min}) \frac{dACL_{Ad}}{dt} = k_1 [ACL_{Ad} (ACL_{Max} - ACL_{Min}) + ACL_{Min}] - k_2 [AC_{Ad} (AC_{Max} - AC_{Min}) + AC_{Min}] \quad \text{Ec. 9.24}$$

$$(CAPE_{Max} - CAPE_{Min}) \frac{dCAPE_{Ad}}{dt} = k_3 [AC_{Ad} (AC_{Max} - AC_{Min}) + AC_{Min}] - k_4 [CAPE_{Ad} (CAPE_{Max} - CAPE_{Min}) + CAPE_{Min}] \quad \text{Ec. 9.25}$$

$$(AC_{Max} - AC_{Min}) \frac{dAC_{Ad}}{dt} = k_1 [ACL_{Ad} (ACL_{Max} - ACL_{Min}) + ACL_{Min}] - (k_2 + k_3) [AC_{Ad} (AC_{Max} - AC_{Min}) + AC_{Min}] + k_4 [CAPE_{Ad} (CAPE_{Max} - CAPE_{Min}) + CAPE_{Min}] \quad \text{Ec. 9.26}$$

Las constantes de reacción se estimaron por ajuste simultáneo de las ecuaciones diferenciales adimensionalizadas (9.24-9.26) usando el software Berkeley-Madonna. Mediante la simulación del sistema de reacciones (hidrólisis y transesterificación) se obtuvieron los valores adimensionales calculados para ACL, AC y CAPE. Estos valores se utilizaron para calcular la concentración de sustrato y productos reales a través del tiempo.

9.5 Resultados y discusión

9.5.1 Actividad clorogenato hidrolasa de enzimas comerciales

La síntesis de CAPE catalizada por clorogenato hidrolasa puede tener ventajas sobre la síntesis catalizada por lipasas. Actualmente no existen clorogenato hidrolasas disponibles comercialmente. Sin embargo, diversos autores han reportado la presencia de actividad clorogenato hidrolasa en preparaciones comerciales de pectinasas, hemicelulasas, tanasas, lipasas y fosfolipasas (Schöbel y Pollmann, 1980; Barbe y Dubourdiou, 1998; Kishimoto *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009). Por ello, evaluamos la actividad clorogenato hidrolasa de diferentes preparaciones comerciales (Tabla 9.1).

Tabla 9.1 Actividad clorogenato hidrolasa de preparaciones enzimáticas comerciales

Enzima	Micro-organismo	Proveedor	No. Catálogo	Actividad clorogenato hidrolasa (U/mL)
Pectinasa	<i>A. niger</i>	Sigma	17389	0.71 ± 0.02*
Pectinasa	<i>A. niger</i>	Fluka	17389	0.36 ± 0.01*
Lipasa	<i>C. antarctica</i>	Sigma**	L3170	0.00 ± 0.00
Lipasa	<i>R. miehei</i>	Sigma**	L4277	0.03 ± 0.00
Lipasa	<i>T. lanuginosus</i>	Sigma**	L0777	0.00 ± 0.00
Hemicelulasa	<i>H. insolens</i>	Novozymes	NS 22002	17.73 ± 0.40
Glucoamilasa	No indicado	Novozymes	NS 22035	0.54 ± 0.00
Xilanasa	No indicado	Novozymes	NS 22083	0.00 ± 0.00
Complejo celulasa	No indicado	Novozymes	NS 22086	0.01 ± 0.02
β-glucosidasa	No indicado	Novozymes	NS 22118	1.62 ± 0.06
Complejo enzimático	<i>A. aculeatus</i>	Novozymes	NS22119	0.32 ± 0.00

*U/g; **Producidas por Novozymes pero comercializadas por Sigma

De las 11 preparaciones enzimáticas evaluadas, la mayor actividad clorogenato hidrolasa (17.73 ± 0.40 U/mL) se encontró en la hemicelulasa NS22002. La hemicelulasa NS22002 es una mezcla de β-glucosasa y xilanasa producidas en fermentación sumergida por *Humicola insolens*. El producto tiene otras actividades secundarias declaradas, como celulasa, arabinasa y pentosanasa. No hay reportes de la actividad clorogenato hidrolasa o FAE de la hemicelulasa NS22002, pero sí hay reportes de actividad FAE en otras preparaciones enzimáticas comerciales producidas por *H. insolens*, tales como Ultraflo L, Pentopan 500 y Depol 740 (Faulds *et al.*, 2002; Hatzakis y Smonou, 2005; Couto *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo reportado por Faulds *et al.* (2002) la FAE producida por *H. insolens* es del tipo B, principalmente, ya que es activa sobre MC, con una pequeña actividad FAE A, ya que es activa en menor medida sobre MS. Además, es capaz de liberar diferulatos a partir de granos agotados de cervecería. De acuerdo con la clasificación propuesta por Crepin *et al.* (2004), las características de la FAE de *H. insolens* se asemejan más a las de una FAE tipo D.

Otras preparaciones comerciales que presentaron actividad clorogenato hidrolasa considerable fueron la β -glucosidasa NS22118 (1.62 ± 0.06 U/mL) y la pectinasa de *A. niger* producida por Sigma (0.71 ± 0.02 U/g). De las lipasas estudiadas, la lipasa de *R. miehei* presentó una pequeña actividad clorogenato hidrolasa (0.03 U/mL), mientras que las lipasas de *C. antarctica* y de *T. lanuginosus* no presentaron actividad clorogenato hidrolasa en las condiciones ensayadas.

9.5.2 Síntesis enzimática de CAPE en disolventes orgánicos

Se estudió la síntesis de CAPE catalizada por una lipasa inmovilizada de *C. antarctica* (Novozym® 435) en isooctano como disolvente. Alternativamente se estudió el uso de una pectinasa liofilizada de *A. niger* (Sigma 17389) con actividad clorogenato hidrolasa (0.71 ± 0.02 U/g) como catalizador para la síntesis de CAPE en isooctano.

Modelamiento de la síntesis enzimática de CAPE

La esterificación entre AC y 2-FE para formar CAPE fue descrita satisfactoriamente mediante un modelo de pseudo primer orden (ecuación 9.8). La constante de reacción aparente (k) se estimó por dos métodos: El primer método estuvo basado en la técnica de regresión lineal. El segundo método se basó en métodos numéricos. El consumo de AC y la formación de CAPE se modelaron usando los parámetros estimados con ambos métodos, y se comparó el ajuste entre los valores observados y los valores estimados.

En la Figura 9.3 se muestran los valores experimentales obtenidos para la esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 en isooctano, así como los valores calculados por el modelo de pseudo primer orden usando los dos métodos. Se observó un mejor ajuste entre los valores observados y los estimados utilizando el segundo método. La aplicación de métodos numéricos presenta una sumatoria del cuadrado del error menor y

un coeficiente de determinación similar al obtenido con las técnicas de regresión, lo cual se traduce en una simulación que describe adecuadamente de los datos experimentales observados (Figura 9.3, Tabla 9.2).

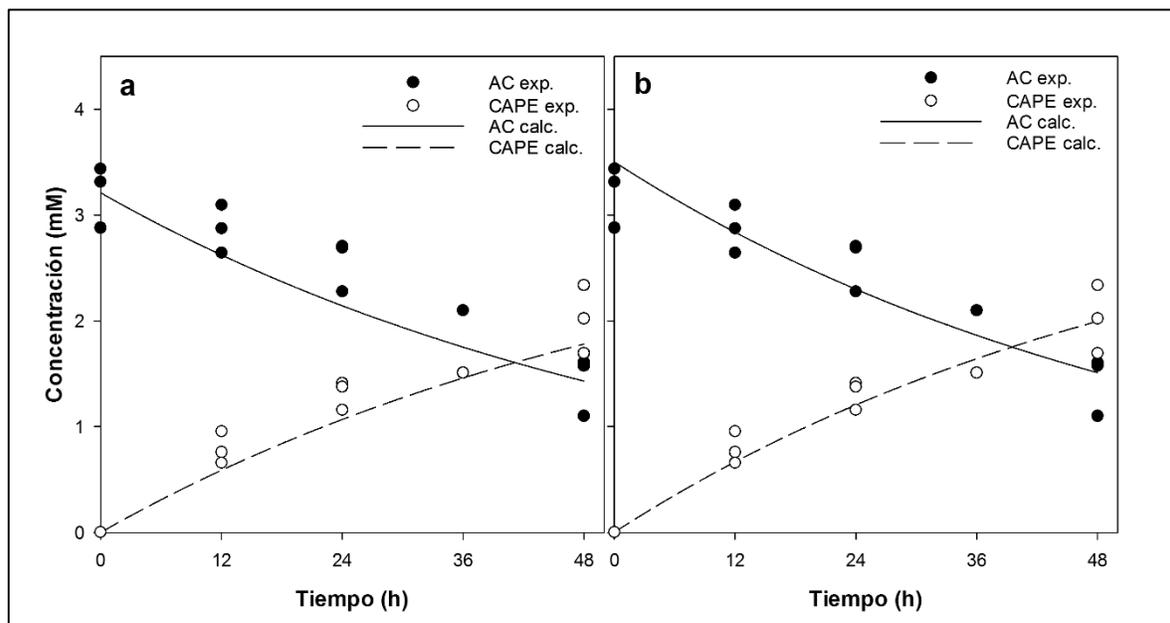


Figura 9.3 Modelamiento de la esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 en isooctano estimando las constantes de reacción por regresión lineal (a) y métodos numéricos (b). Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

Tabla 9.2 Suma de errores al cuadrado y coeficiente de determinación entre los datos experimentales y los datos calculados estimando las constantes de reacción por regresión lineal y métodos numéricos*

	Suma de errores al cuadrado (SEC)		Coeficiente de determinación (R^2)	
	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
AC	1.3769	1.0897	0.8434	0.8412
CAPE	0.7749	0.3979	0.9477	0.9483

*Datos obtenidos de la esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 en isooctano.

Las diferencias entre los ajustes obtenidos con ambos métodos están relacionadas con la manera de estimar los parámetros. El método 2 utiliza simultáneamente todos los datos de concentración de AC y CAPE para calcular los parámetros, y permite estimar los valores

iniciales de AC y CAPE (AC_0 y $CAPE_0$). El método 1 utiliza los valores de concentración de producto para estimar la constante de reacción y no permite la estimación de AC_0 y $CAPE_0$. Por otra parte, la adimensionalización de los datos disminuye el sesgo en la estimación de los parámetros debido a que se otorga el mismo peso ponderado a la concentración de sustrato y producto adimensionales al minimizar la suma de cuadrados del error.

La estimación de los parámetros por métodos numéricos presentó ventajas sobre los cálculos por regresión, como el mejor ajuste del modelo a los datos experimentales y la posibilidad de estimar los valores iniciales de sustrato y producto. Además, la estimación de los parámetros de reacciones complejas es mucho más sencilla utilizando métodos numéricos con respecto a los métodos analíticos. Debido a esto, la estimación de los parámetros para las siguientes reacciones se realizó por métodos numéricos.

Síntesis de CAPE por reacciones de esterificación y transesterificación

La lipasa B de *C. antarctica* (Novozym® 435) fue capaz de catalizar la síntesis de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE, pero fue ineficiente para catalizar la síntesis de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE. Se estudió el uso de una pectinasa de *A. niger* (Sigma 17389) como catalizador en la síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación. Sin embargo, en las condiciones ensayadas, no se observó formación de producto.

La Figura 9.4 muestra los perfiles de producción de CAPE y consumo de sustrato durante las reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por Novozym® 435 en isooctano. La tabla 9.3 muestra los parámetros obtenidos para las mismas reacciones. La máxima concentración de CAPE (2.02 ± 0.32 mM) se obtuvo mediante la reacción de esterificación, la concentración final de CAPE fue mucho menor (0.019 ± 0.000 mM).

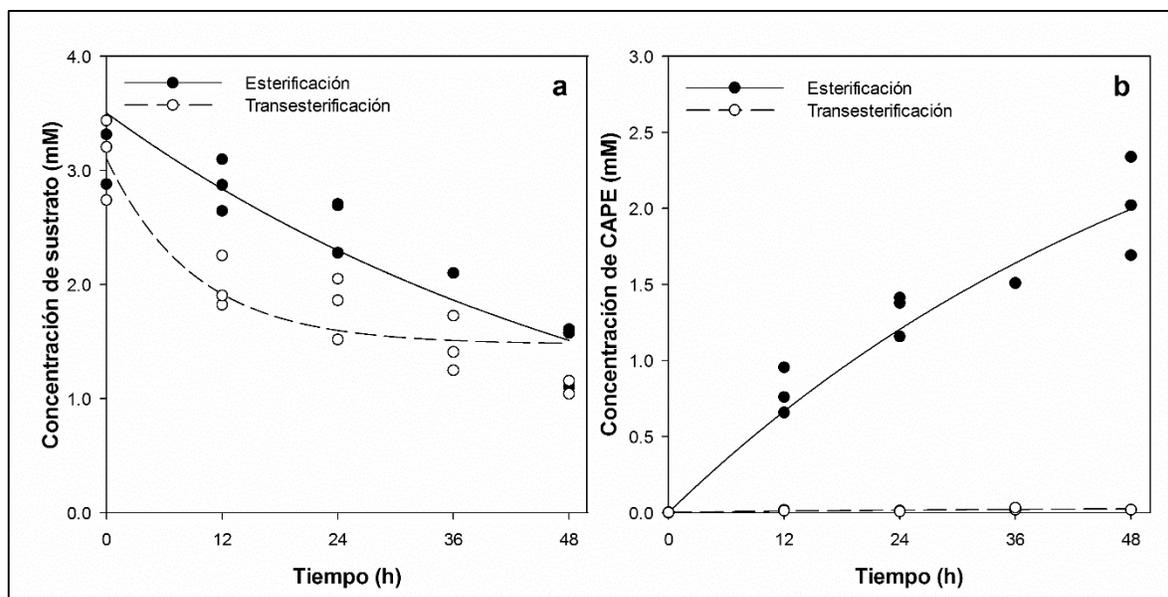


Figura 9.4 Consumo de sustrato (a) y producción de CAPE (b) mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por Novozym® 435 en isooctano. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

Tabla 9.3 Síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por Novozym® 435 en isooctano

Sustrato	Conversión x 100	Rendimiento x 100	k (h ⁻¹)
Ac. Cafeico	61.42 ± 7.66	88.74 ± 8.57	0.0175
Ac. Clorogénico	70.30 ± 2.15	0.91 ± 0.30	0.0004

*La conversión y el rendimiento se calcularon con los valores experimentales. La constante de reacción (k) se estimó con el modelo de pseudo primer orden

En la reacción de esterificación se obtuvo una conversión del $61.42 \pm 7.66\%$ y un rendimiento del $88.74 \pm 8.57\%$ a las 48 h de reacción y un valor de k de 0.0175 h^{-1} . Esta conversión es menor a la obtenida por Widjaja *et al.* (2008) en condiciones similares. En el trabajo de Widjaja *et al.*, utilizaron una lipasa con mayor actividad nominal (7000 PLU/g) a la utilizada en el presente trabajo (5000 PLU/g). Sin embargo, se utilizó una mayor cantidad de biocatalizador (42 mg) para mantener la misma actividad enzimática por unidad experimental (210 PLU). Las diferencias en la conversión pueden estar relacionadas al control de la temperatura y la agitación, debido a las diferencias entre los equipos utilizados para este fin.

En la reacción de transesterificación se observó un consumo significativo de ACL a las 48 h de reacción, con una conversión de 70.30%. Pero el rendimiento fue muy bajo (0.91%), lo cual indica la formación de al menos un producto secundario. Los cromatogramas de la mezcla de reacción mostraron un compuesto con un espectro de absorción similar al AC y ACL, pero cuyo tiempo de retención no corresponde al de estos compuestos, ni al de los isómeros más comunes del ACL (ácido neoclorogénico y criptoclorogénico).

Olguín-Gutiérrez (2010) obtuvo resultados similares. Se utilizaron 6 lipasas para la síntesis de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE. De las 6 lipasas evaluadas, sólo la lipasa lip2 de *Yarrowia lipolytica* inmovilizada en lewatit K2629 catalizó la síntesis de CAPE en cantidades traza (1.2%). Sin embargo, el autor atribuyó la catálisis a los grupos sulfónicos del soporte. La baja producción de AC y CAPE puede deberse a un impedimento estérico causado por la presencia del grupo quínico en el ACL, o a la inhibición de la enzima por el AQ liberado. Olguín-Gutiérrez (2010) también estudió la síntesis de CAPE catalizada por una clorogenato hidrolasa de *A. ochraceus*. La clorogenato hidrolasa fue capaz de catalizar la síntesis de CAPE en un sistema diisopropileter-agua (rendimiento = 9.4%), pero fue incapaz de catalizar la reacción cuando se utilizó isooctano como disolvente.

Efecto del disolvente de reacción

Se estudió el efecto del disolvente sobre la síntesis de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435. En la Tabla 9.4 se muestran los sistemas de disolventes utilizados. La adición de cosolventes al isooctano (tetrahidrofurano y acetona) mejoró la solubilidad del AC, pero tuvo un efecto negativo sobre la conversión de AC a CAPE (Figura 9.5).

Tabla 9.4 Caracterización de síntesis de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 en diferentes sistemas de solventes

Solvente	Conversión x 100	Rendimiento x 100	k (h ⁻¹)
Isooctano	61.42 ± 7.66	88.74 ± 8.57	0.0175
Isooctano + THF	90.21 ± 0.92	32.64 ± 3.07	0.0167
Isooctano + acetona	64.47 ± 0.24	26.52 ± 2.95	0.0069
<i>Terc</i> -butanol	56.61 ± 1.72	11.46 ± 0.83	0.0020
<i>Terc</i> -butanol + DMSO	52.60 ± 2.02	20.55 ± 0.39	0.0027
<i>Terc</i> -butanol + DMF	53.97 ± 1.23	9.23 ± 2.44	0.0015

*La conversión y el rendimiento se calcularon con los valores experimentales. La constante de reacción (k) se estimó con el modelo de pseudo primer orden

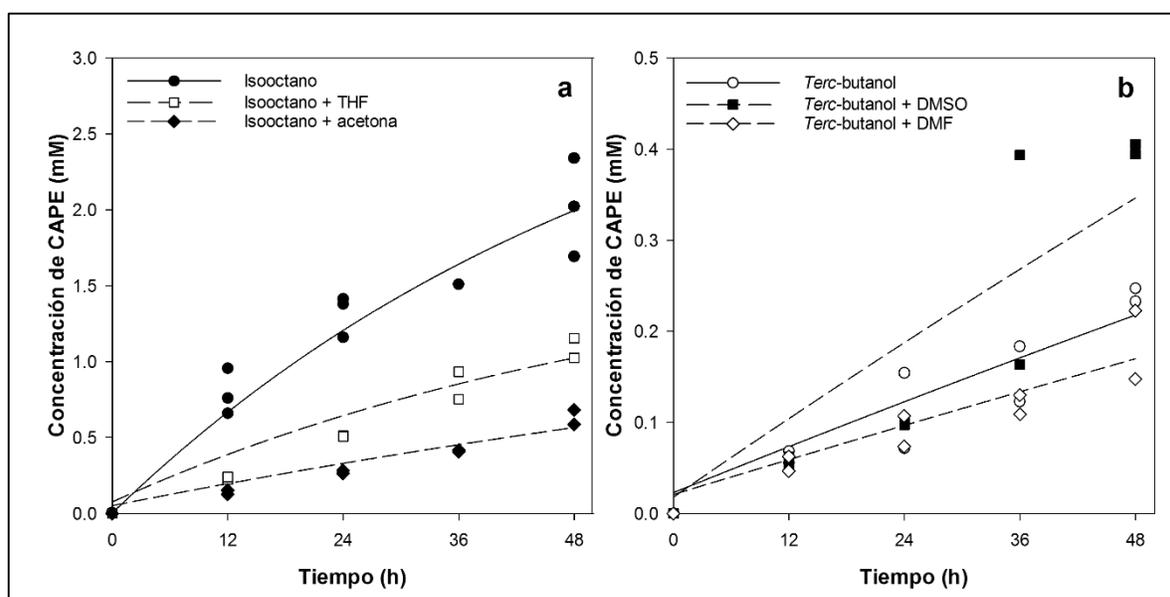


Figura 9.5 Síntesis enzimática de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE catalizada por Novozym® 435 usando diferentes sistemas de solventes. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

Con el sistema isooctano-THF (9:1) se obtuvo una conversión alta (90.21 ± 0.92%). Sin embargo, el rendimiento fue muy bajo (32.64 ± 3.07%), lo cual indica la formación de subproductos durante la reacción. Esto condujo a una baja concentración final de CAPE (1.09 ± 0.09mM). El uso de un disolvente más polar (*terc*-butanol) solo o en presencia de cosolventes (DMSO y DMF) afectó drásticamente la producción de CAPE. Usando estos disolventes, la concentración de CAPE fue de 0.18-0.40 mM a las 48 h de reacción.

Widjaja *et al.* (2008) estudiaron el efecto del solvente sobre la conversión de AC a CAPE catalizada por Novozym® 435 y observaron una mayor conversión con solventes no polares, como el isooctano. Resultados similares fueron obtenidos por Olguín-Gutiérrez (2010). Los solventes polares tienen un efecto negativo en las enzimas ya que pueden secuestrar moléculas de agua necesarias para mantener la estructura terciaria de las proteínas.

9.5.3 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones

Se estudió la síntesis enzimática en microemulsiones agua en aceite (agua-AOT-isoctano), como una alternativa a la síntesis en solventes orgánicos. Se evaluó la síntesis enzimática de CAPE por esterificación entre AC y 2-FE y por transesterificación entre ACL y 2-FE usando una lipasa (Lipozyme® CALB) y una hemicelulasa (Novozymes NS22002) comerciales. La Figura 9.6 muestra las cinéticas de producción de CAPE para ambas reacciones. La Tabla 9.5 muestra los parámetros calculados para estas reacciones.

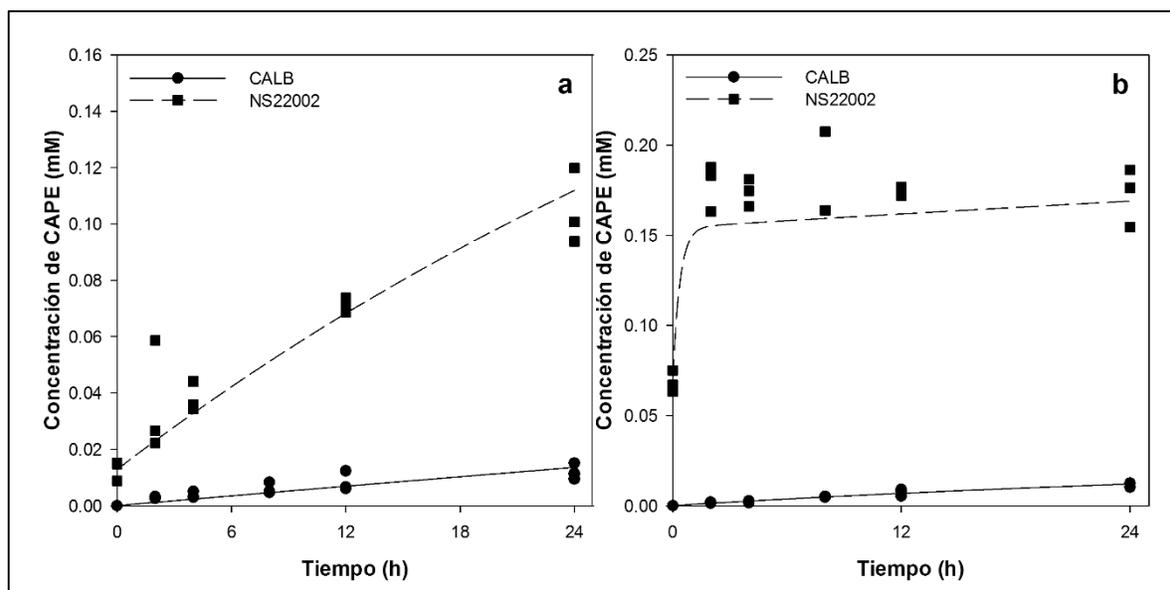


Figura 9.6 Curvas de progreso de la síntesis de CAPE por esterificación (a) y transesterificación (b) en microemulsiones usando una lipasa (CALB) y una hemicelulasa (NS22002) como catalizadores. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

Tabla 9.5 Síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por enzimas comerciales en microemulsiones

Enzima	Sustrato	Conversión x 100	Rendimiento x 100	k (h ⁻¹)
CALB	Ac. Cafeico	12.23 ± 0.00	40.29 ± 2.75	0.0025
CALB	Ac. Clorogénico	28.21 ± 5.83	10.25 ± 8.93	0.0027
NS22002	Ac. Cafeico	39.45 ± 10.74	42.65 ± 5.48	0.0198
NS22002	Ac. Clorogénico	100.00 ± 0.00	70.15 ± 6.58	2.7178

*La conversión y el rendimiento se calcularon con los valores experimentales. La constante de reacción (k) se estimó con el modelo de pseudo primer orden

Ambas reacciones (esterificación y transesterificación) fueron catalizadas por ambas enzimas (CALB y NS22002). Pero las reacciones fueron mucho más eficientes cuando se utilizó la hemicelulasa NS22002. La concentración final de CAPE en los tratamientos con lipasa como catalizador fue de 0.01 mM. Mientras que la concentración de CAPE en las reacciones catalizadas por NS22002 fue 8 y 10 veces mayor para las reacciones de esterificación y transesterificación, respectivamente.

La constante cinética de pseudo primer orden fue cercana para ambas reacciones catalizadas por CALB ($k = 0.0025$ y 0.0027 h⁻¹). La constante cinética de las reacciones catalizadas por NS22002 fue 8 y 990 veces mayor para las reacciones de esterificación y transesterificación, comparada con las reacciones catalizadas por CALB.

La síntesis de ésteres de AC catalizada por lipasa es particularmente ineficiente debido a la inhibición de la enzima por sustratos con una sustitución hidroxilo en la posición *para* del anillo aromático y un doble enlace conjugado en la cadena lateral (como en el AC). Este fenómeno se debe a un efecto electrónico más que a un efecto estérico (Guyot *et al.*, 1997). La esterificación de AC y 2-FE catalizada con Novozym® 435 se puede llevar a altas conversiones y rendimientos (92-100%). Sin embargo, para obtener estos resultados se requiere de una gran cantidad de catalizador (15-17.8 mg de biocatalizador/mg AC) (Widjaja *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Ha *et al.*, 2012).

La máxima conversión de AC (100%) y máximo rendimiento de CAPE observada (70.15%) se obtuvo para la transesterificación de ACL a CAPE catalizada por NS22002. Esta conversión se alcanzó en tan solo 2 h de reacción. Por ello, para los siguientes experimentos sólo se estudió la transesterificación del ACL en microemulsiones.

Durante la reacción de transesterificación entre ACL y 2-FE catalizada por la hemicelulasa NS22002 en microemulsiones se observó la formación simultánea de AC y CAPE. Los datos de producción de AC y CAPE se analizaron como reacciones en paralelo usando las ecuaciones 9.17-9.19. Se estudió el efecto de las condiciones de reacción (temperatura, pH, w_0 y concentración de AOT) sobre la síntesis de CAPE catalizada por la hemicelulasa NS22002 en microemulsiones (agua-AOT-isooctano).

Efecto de la temperatura

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la síntesis de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE en una microemulsión agua-AOT-isooctano catalizada por la hemicelulasa comercial NS22002. La microemulsión se preparó añadiendo 50 μL de ACL 20 mM y 20 μL de enzima comercial a 4 mL de solución madre (AOT 100 mM, 2-FE 100 mM en isooctano). El sistema tuvo una concentración inicial de sustrato de 0.2447 mM y una $w_0 = 10$. La solución de sustrato se preparó en un buffer de fosfatos 50 mM. Sin embargo, el pH de la solución fue de 4.5 debido a la alta concentración de ACL.

El perfil de la constante de reacción (k_1) en función de la temperatura mostró un perfil típico de reacciones enzimáticas (Figura 9.7a). Los valores de k_1 corresponden a la aplicación de las ecuaciones 9.17-9.19. Se observó un efecto positivo de la temperatura sobre la síntesis de CAPE hasta los 50 °C. La constante cinética de pseudo primer orden (k_1) se incrementó de 0.365 a 1.010 h^{-1} cuando se incrementó la temperatura de reacción de 30 a 50 °C, y disminuyó hasta 0.540 h^{-1} a los 70 °C (Figura 9.7a). Usando la ecuación de Arrhenius se estimó la Energía de Activación que fue cercana a 13062 cal/mol y con un valor de Q_{10} cercano a 2. Estos valores indican que en las condiciones ensayadas no existieron problemas de transferencia de masa en la reacción.

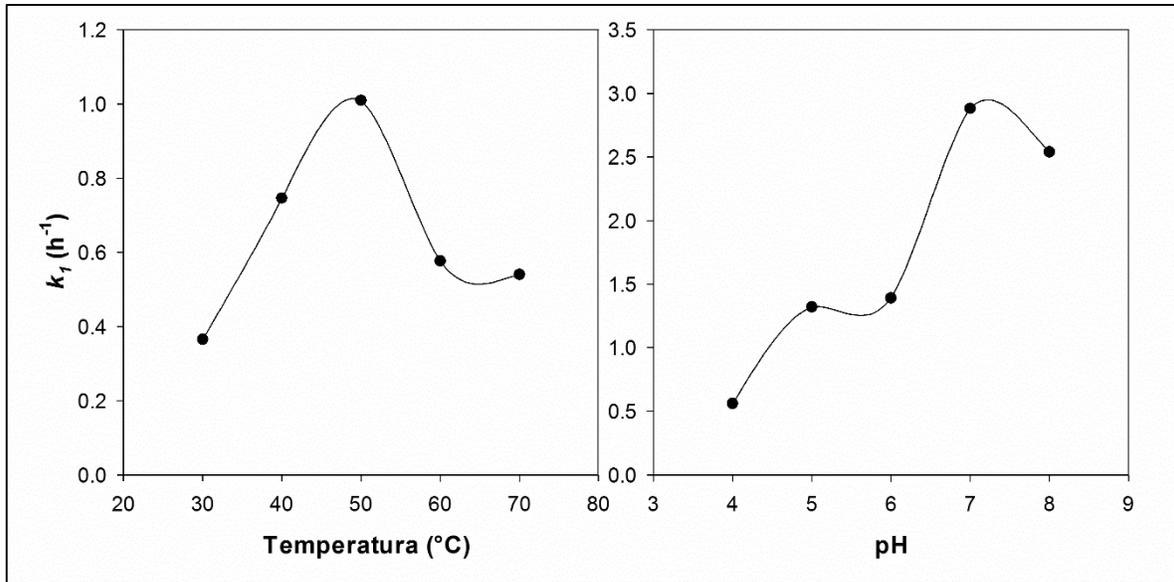


Figura 9.7 Efecto de la temperatura (a) y del pH (b) sobre la constante cinética de producción de CAPE en microemulsiones. El estudio del efecto de la temperatura se realizó en un sistema no amortiguado (pH = 4.5). El estudio del pH se realizó a 50 °C.

La conversión de AC fue mayor a 50 °C (93.33 ± 0.29) pero el mayor rendimiento (71.81 ± 4.98) se obtuvo a 40 °C (Tabla 9.6). La concentración final de CAPE fue de 0.146 a 0.164 mM cuando la reacción se llevó a cabo en el rango de temperatura de 30 a 50 °C, pero la máxima concentración se obtuvo en un tiempo más corto a 50 °C. A 70 °C se obtuvo una concentración final de CAPE de 0.065 ± 0.002 mM. Para los siguientes experimentos se eligió una temperatura de 50 °C.

Tabla 9.6 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la temperatura

Temperatura (°C)	Conversión x 100	Rendimiento x 100	Concentración final CAPE (mM)
30	89.87 ± 0.78	67.86 ± 3.00	0.150 ± 0.006
40	92.76 ± 0.89	71.81 ± 4.98	0.164 ± 0.010
50	93.33 ± 0.29	63.73 ± 0.72	0.146 ± 0.001
60	87.52 ± 1.41	58.81 ± 0.62	0.126 ± 0.002
70	73.39 ± 3.17	36.32 ± 2.25	0.065 ± 0.002

*La conversión, el rendimiento y concentración final de CAPE corresponden a los valores experimentales.

El incremento de la temperatura favorece la solubilidad de los sustratos y el contacto entre los sustratos y la enzima. Sin embargo, altas temperaturas pueden inducir la

desnaturalización de las proteínas. No hay reportes sobre la estabilidad térmica de la actividad clorogenato hidrolasa de *H. insolens*, pero si se han caracterizado enzimas relacionadas producidas por este microorganismo. Por ejemplo, Faulds *et al.* (2002) caracterizó la actividad FAE presente en una preparación comercial de *H. insolens* (Ultraflo L) y encontró la máxima actividad (sobre MF) a una temperatura de 60-65 °C. Sin embargo, la enzima pierde el 40% de su actividad después de ser incubada 90 min a 60 °C.

Efecto del pH

Se evaluó el efecto del pH sobre la conversión de AC a CAPE (Figura 9.7b, Tabla 9.7). La máxima concentración de CAPE (0.143-0.155 mM) se encontró cuando se usó un pH en el rango de 5 a 7. La mayor conversión de AC (95.55 ± 0.40%) y el mayor rendimiento (65.95 ± 2.80%) se obtuvieron a pH 5, pero la mayor constante cinética (2.54-2.88 h⁻¹) se obtuvo a pH 7.0-8.0. En los siguientes experimentos las reacciones se llevaron a cabo a pH 6, debido a la mayor estabilidad del ACL a este pH.

Tabla 9.7 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto del pH

pH	Conversión x 100	Rendimiento x 100	Concentración final CAPE (mM)
4	82.89 ± 2.80	63.11 ± 2.13	0.129 ± 0.008
5	95.55 ± 0.40	65.95 ± 2.80	0.155 ± 0.006
6	93.99 ± 0.76	61.72 ± 3.40	0.143 ± 0.009
7	94.36 ± 1.01	63.56 ± 7.46	0.147 ± 0.018
8	95.15 ± 0.11	45.81 ± 3.04	0.107 ± 0.007

*La conversión, el rendimiento y concentración final de CAPE corresponden a los valores experimentales.

Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Kishimoto *et al.* (2005) para la síntesis de CAPE por transesterificación entre ACLy 2-FE en un sistema bifásico agua-2-FE. Ellos encontraron la mayor producción de CAPE cuando la reacción se llevó a cabo a pH ácido (3.0-4.0) y sólo observaron trazas de CAPE a pH neutro. Estas diferencias pueden estar relacionadas a la enzima utilizada, ya que Kishimoto *et al.* (2005) usaron una clorogenato hidrolasa de *A. japonicus*.

El pH puede afectar las reacciones enzimáticas en varias maneras. El pH puede modificar la ionización de los grupos funcionales del sitio activo y modificar su conformación. El pH también puede afectar la ionización del sustrato, modificando su

solubilidad y reactividad. Cambios extremos de pH puede afectar la estabilidad de la enzima y producir cambios irreversibles en su estructura (Segel, 1993).

Efecto de la relación molar H_2O/AOT (w_0)

Se estudió el efecto del grado de hidratación del surfactante (w_0) sobre la síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones. La w_0 se define como la relación molar entre la concentración del agua y el surfactante en el sistema y determina el tamaño de las micelas reversas (Levashov y Klyachko, 2001). El valor de w_0 se modificó agregando cantidades proporcionales de enzima y solución de sustrato, mientras que la concentración de surfactante se mantuvo constante (100 mM).

Se observó un incremento en la constante cinética de producción de CAPE y en la concentración final de CAPE a mayores valores de w_0 (Figura 9.8a, Tabla 9.8). Estos incrementos pueden estar relacionados a la mayor concentración inicial de enzima y sustrato, más que al grado de hidratación del surfactante. La conversión (93.99-96.78%) y el rendimiento (54.81-61.72%) son similares para los sistemas con valores de w_0 entre 10 y 20 y la concentración final de CAPE es proporcional a la concentración inicial de sustrato.

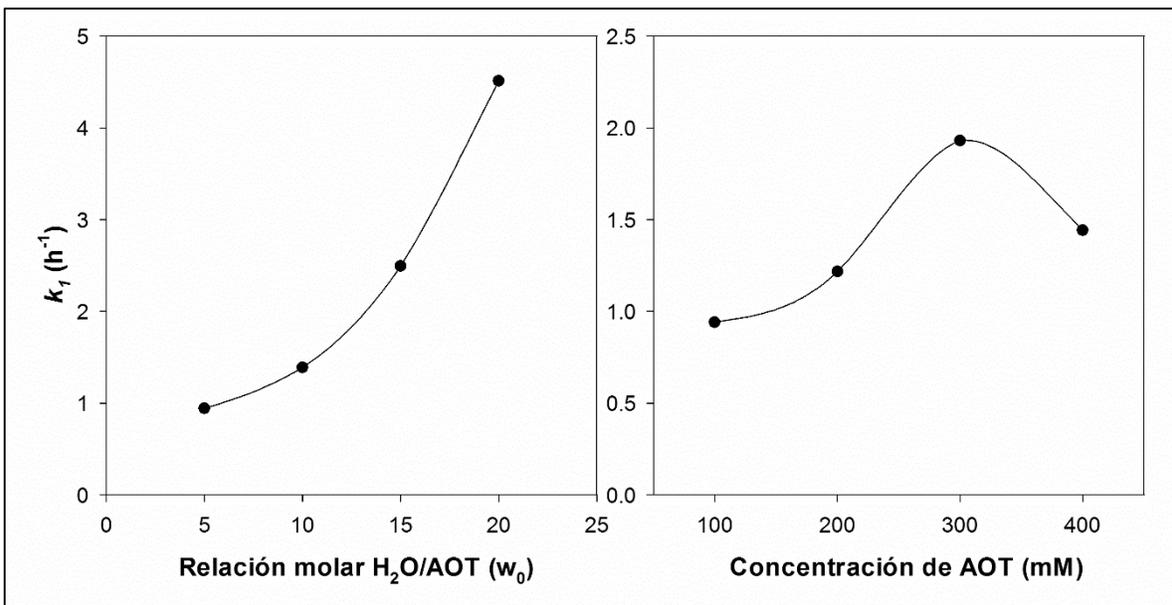


Figura 9.8 Efecto del grado de hidratación del surfactante (a) y de la concentración del surfactante (b) sobre la síntesis enzimática de CAPE. Las reacciones se llevaron a cabo a 50 °C y pH 6.0.

Tabla 9.8 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la w_0

w_0	[ACL] inicial (mM)	Rendimiento x 100	Rendimiento x 100	Concentración (mM)
5	0.124	91.36 ± 0.32	81.24 ± 2.42	0.092 ± 0.003
10	0.246	93.99 ± 0.76	61.72 ± 3.40	0.143 ± 0.009
15	0.365	96.50 ± 0.04	60.05 ± 0.28	0.212 ± 0.001
20	0.483	96.78 ± 0.49	54.81 ± 1.38	0.256 ± 0.006

*La conversión, el rendimiento y concentración final de CAPE corresponden a los valores experimentales.

En el caso de la reacción usando la w_0 de 5 se observó un rendimiento significativamente mayor a los obtenidos en los otros sistemas. Esto puede estar relacionado con la disminución de la actividad acuosa. La actividad acuosa de las emulsiones basadas en AOT es de aproximadamente 0.9 para una $w_0 = 10$ y de 0.8 para una $w_0 = 5$. Esta disminución en la actividad acuosa puede favorecer las reacciones de síntesis sobre las reacciones de hidrólisis (Carvalho y Cabral, 2000).

Efecto de la concentración de surfactante (AOT)

Se estudió el efecto de la concentración de AOT sobre la síntesis enzimática de CAPE manteniendo la $w_0 = 5$. Esto permitió aumentar la cantidad de agua en el sistema sin modificar la w_0 . La cantidad de agua se modificó añadiendo cantidades proporcionales de enzima y de solución concentrada de sustrato. Los resultados de este experimento se resumen en la Tabla 9.9 y la Figura 9.8b.

Tabla 9.9 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la concentración de AOT

[AOT] (mM)	[ACL] inicial (mM)	Conversión x 100	Rendimiento x 100	Concentración (mM)
100	0.124	91.36 ± 0.32	81.24 ± 2.42	0.092 ± 0.003
200	0.246	95.44 ± 0.30	67.83 ± 2.39	0.159 ± 0.004
300	0.365	96.70 ± 0.08	62.59 ± 1.87	0.221 ± 0.005
400	0.483	96.95 ± 0.14	54.95 ± 1.06	0.257 ± 0.005

*La conversión, el rendimiento y concentración final de CAPE corresponden a los valores experimentales.

Se observaron conversiones similares para los sistemas con concentración de AOT de 200 a 400 mM (95.44-96.95%). El rendimiento con la concentración 400 mM (54.95 ± 1.06) fue menor al obtenido con las concentraciones 200 y 300 mM de AOT (62.59-67.83%). El mayor rendimiento se obtuvo con la concentración de AOT = 100 mM ($81.24 \pm 2.42\%$).

La concentración final de CAPE fue proporcional a la concentración inicial de sustrato, y fue muy cercana a la obtenida a diferentes valores de w_0 , pero con la misma concentración de inicial ACL (Tablas 9.8 y 9.9). Se observó un incremento de la constante cinética (k_1) con el aumento de la concentración de AOT (y de la concentración inicial de ACL y enzima). Sin embargo, la constante fue siempre menor a la obtenida con una concentración similar de ACL pero con una concentración de AOT = 100 mM. Para los siguientes experimentos se utilizó un sistema con una concentración de AOT = 100 mM y una $w_0 = 20$, ya que en este sistema se obtuvo la mayor concentración final de CAPE.

Síntesis CAPE a partir de un extracto de PC catalizada por la hemicelulasa NS22002

Se estudió la síntesis de CAPE catalizada por la enzima NS22002 en microemulsiones usando un extracto rico en ACL obtenido de la PC como sustrato. Se utilizaron las condiciones previamente seleccionadas (50 °C, pH 6, $w_0 = 20$ y concentración de AOT 100 mM) pero se sustituyó el ACL grado analítico por un extracto de PC con un contenido de ACL del 61.7% (obtenido en el capítulo 7). El extracto se disolvió en buffer de citratos fosfatos (pH 6, 50 mM) para dar una concentración 20 mM de ACL y se ajustó el pH de la solución a 6.0 con NaOH 2M.

En la Figura 9.9 se muestran los perfiles de consumo de ACL y producción de AC y CAPE para las reacciones de transesterificación usando ACL y extracto de PC como sustratos. Se observó un comportamiento similar en ambas reacciones, independientemente de la pureza del sustrato. Se observó una conversión (95.48-95.49%) y un rendimiento similar en ambas reacciones. La constante cinética (k) fue mayor cuando se utilizó el ACL grado reactivo, probablemente debido a las impurezas presentes en el extracto de PC (Tabla 9.10).

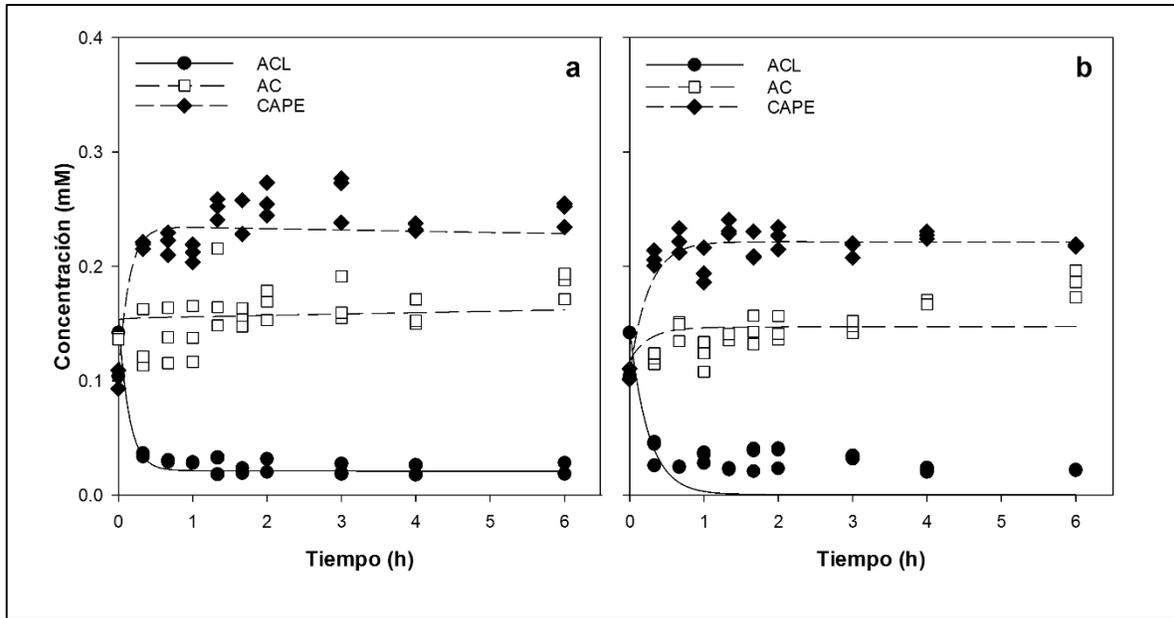


Figura 9.9 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por Novozymes NS22002 en microemulsiones usando ACL (a) y un extracto de PC (b) como sustrato. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

Tabla 9.10 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por una preparación enzimática comercial (NS22002) usando ACL y extracto de PC como sustrato

Sustrato	Conversión x 100	Rendimiento x 100	k_1 (h ⁻¹)
ACL	95.49 ± 1.15	53.57 ± 1.79	6.492
Extracto de PC	95.48 ± 0.06	47.31 ± 0.16	3.148

*La conversión y el rendimiento se calcularon con los valores experimentales. La constante de reacción (k) se estimó con el modelo de pseudo primer orden

Estos resultados difieren de los obtenidos por Olgún-Gutiérrez (2010) para la síntesis enzimática de CAPE a partir de un extracto de cascarilla de café usando una lipasa inmovilizada de *C. antarctica* como biocatalizador (Novozym® 435) e isooctano como solvente de la reacción. Después de 148 h no observó formación de producto y atribuyó este resultado a las impurezas presentes en el extracto. El extracto utilizado en esa investigación tuvo un contenido de 88 mg de AC/g de extracto. En el presente trabajo utilizamos un extracto de PC parcialmente purificado (ver capítulo 7) el cual tiene un contenido de 617.1 mg de ACL/g de extracto.

9.5.4 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos producidos en FMS

Se evaluó la capacidad de 9 extractos enzimáticos producidos por *Aspergillus* spp para catalizar la síntesis de CAPE en microemulsiones. Los extractos fueron producidos en un sistema de FMS como se describió en el capítulo 8, se concentraron por ultrafiltración y se diluyeron con buffer de fosfatos (pH 6.5, 50 mM) para obtener extractos con la misma actividad volumétrica (1.7 U/mL). Estos extractos se utilizaron para catalizar la síntesis de CAPE por transesterificación entre ACL y 2-FE en el sistema de microemulsión previamente seleccionado (50 °C, pH 6, $w_0 = 20$ y concentración de AOT 100 mM). La Figura 9.10 muestra los perfiles de producción de CAPE obtenido con los extractos producidos por las diferentes cepas evaluadas. Los 9 extractos enzimáticos evaluados fueron capaces de catalizar la síntesis de CAPE a partir de ACL y 2-FE en el sistema de microemulsiones estudiado.

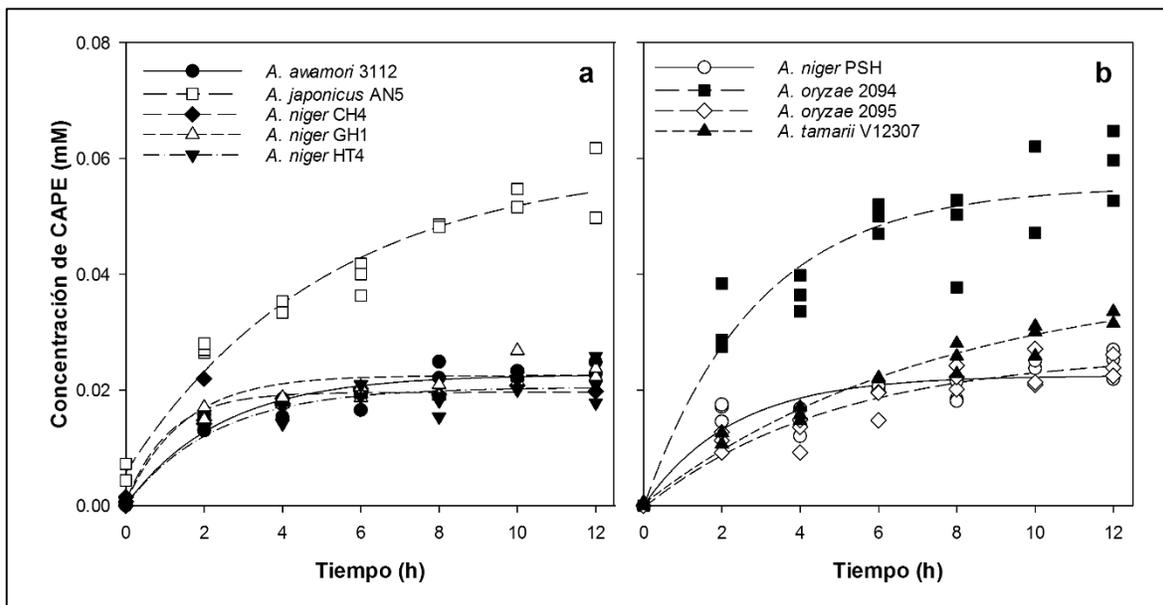


Figura 9.10 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos de *Aspergillus* spp producidos en FMS. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden

Se observaron perfiles similares para todas las reacciones (ver anexo 3). Primero, el ACL es hidrolizado completamente a AC después, se observó la acumulación de CAPE a una tasa mucho más lenta. Este comportamiento corresponde al de un sistema de reacciones

en serie, el cual difiere del sistema de reacciones en paralelo observado en la síntesis de CAPE catalizada por la enzima comercial NS22002. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el origen de las enzimas. De acuerdo con lo reportado en la bibliografía, la actividad clorogenato hidrolasa presente en la preparación comercial NS22002 puede estar relacionada a la presencia de una FAE tipo B o D de *H. insolens* (Faulds *et al.*, 2002; Crepin *et al.*, 2004). Mientras que la actividad clorogenato hidrolasa de los extractos enzimáticos puede deberse a una FAE tipo B o a una verdadera clorogenato hidrolasa.

La FAE tipo B y D, así como la clorogenato hidrolasa son capaces de hidrolizar ésteres del AC, como el ACL. Sin embargo tienen diferencias estructurales importantes y, probablemente, diferentes mecanismos de acción. Para entender mejor las diferencias entre ambas reacciones es necesario purificar y caracterizar las enzimas utilizadas.

En todos los casos se observó una conversión mayor al 90%. El rendimiento de las reacciones se fue bajo (4.51 a 12.39%), debido probablemente a la formación de AC (Tabla 9.11). La concentración final de CAPE (después de 12 h) varió de 0.018 a 0.065 mM para las diferentes reacciones. El máximo rendimiento (11.74-12.39%) y la mayor concentración final de CAPE (0.056-0.059 mM) se obtuvo con los extractos producidos por *A. japonicus* AN5 y *A. oryzae* 2094. De acuerdo con estos resultados, los extractos producidos por estas dos cepas son adecuados para la síntesis de CAPE.

Tabla 9.11 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos de *Aspergillus* spp producidos en FMS

Extracto enzimático	Conversión x 100	Rendimiento x 100	k (h ⁻¹)
<i>A. awamori</i> 3112	98.36 ± 0.05	5.00 ± 0.32	0.022
<i>A. japonicus</i> AN5	98.38 ± 0.04	11.74 ± 1.78	0.027
<i>A. niger</i> CH4	93.18 ± 0.65	4.50 ± 0.12	0.043
<i>A. niger</i> GH1	98.07 ± 0.59	4.86 ± 0.24	0.036
<i>A. niger</i> HT4	98.52 ± 0.28	4.51 ± 0.86	0.022
<i>A. niger</i> PSH	98.45 ± 0.27	5.19 ± 0.55	0.024
<i>A. oryzae</i> 2094	98.66 ± 0.22	12.39 ± 1.25	0.048
<i>A. oryzae</i> 2095	98.39 ± 0.24	5.08 ± 0.38	0.013
<i>A. tamaritii</i> V12307	98.18 ± 0.54	6.93 ± 0.27	0.012

*La conversión y el rendimiento se calcularon con los valores experimentales. La constante de reacción (k) se estimó con el modelo de pseudo primer orden

En el capítulo 8 se estudió la producción de enzimas con actividad clorogenato hidrolasa por hongos del género *Aspergillus* en un sistema de FMS. La mayor actividad clorogenato hidrolasa (0.786 ± 0.006 U/g ms) se obtuvo con *A. oryzae* 2094 a las 24 h. Sin embargo, esta actividad decayó a la mitad (0.403 ± 0.045 U/g ms), aproximadamente, a las 40 h. Este decaimiento de la actividad enzimática puede deberse a la inestabilidad de la enzima o a la presencia de proteasas, lo cual no es deseable para una aplicación práctica, como la síntesis de CAPE. Por ello, para el siguiente experimento sólo se utilizó el extracto enzimático producido por *A. japonicus* AN5.

Síntesis CAPE a partir de un extracto de PC catalizada por un extracto enzimático de *A. japonicus*

Finalmente se estudió la síntesis enzimática de CAPE catalizada por un extracto enzimático concentrado producido por *A. japonicus* AN5 (actividad volumétrica = 13.1 U/mL) en un sistema de microemulsión agua-AOT-isoctano previamente descrito (50 °C, pH 6.0, $w_0 = 20$, concentración de AOT= 100 mM). La reacción se llevó a cabo utilizando ACL grado reactivo y un extracto de PC rico en ACL (pureza = 61.7%). La Figura 9.11 muestra los perfiles de consumo de ACL y acumulación de AC y CAPE para las reacciones catalizadas por el extracto enzimático concentrado de *A. japonicus* AN5 utilizando ACL grado analítico y un extracto de PC. La Tabla 9.12 muestra los parámetros calculados para estas reacciones (conversión, rendimiento y constante de reacción).

Tabla 9.12 Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por un extracto enzimático concentrado de *A. japonicus* usando ACL (a) y extracto de PC (b) como sustrato

Sustrato	Conversión x 100	Rendimiento x 100	k (h ⁻¹)
ACL	97.24 ± 0.30	37.10 ± 2.06	0.083
Extracto PC	100.00 ± 0.00	34.48 ± 5.58	0.079

*La conversión y el rendimiento se calcularon con los valores experimentales. La constante de reacción (k) se estimó con el modelo de pseudo primer orden

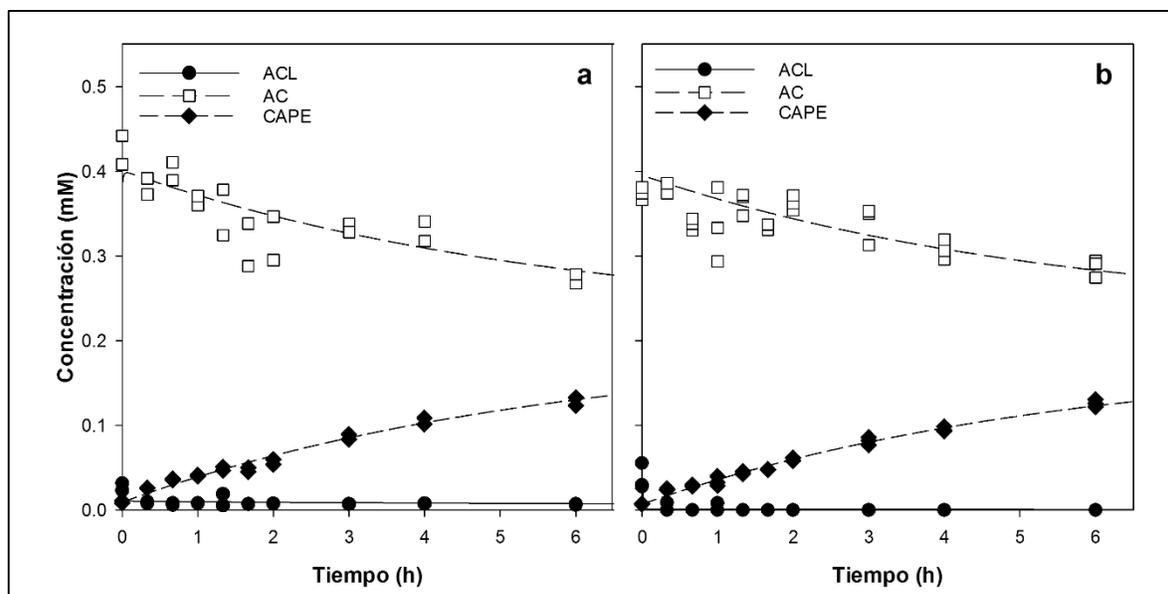


Figura 9.11 Síntesis enzimática de CAPE en microemulsiones catalizada por un extracto enzimático concentrado de *A. japonicus* usando ACL (a) y extracto de PC (b) como sustrato. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

El rendimiento ($11.74 \pm 1.78\%$) y la constante de reacción (0.083 h^{-1}) para la transesterificación entre ACL y 2-FE catalizada por el extracto enzimático concentrado de *A. japonicus* AN5 fue 3 veces mayor a la obtenida con el extracto enzimático estandarizado a 1.7 U/mL . Esto se puede explicar al menos parcialmente debido a que la actividad enzimática del extracto concentrado es 7.7 veces mayor que la del extracto estandarizado.

La conversión de la reacción de transesterificación fue mayor al 97% independientemente de la pureza del ACL. El rendimiento (34.48-37.10%), las constantes de reacción (0.079 - 0.083 h^{-1}) y la concentración final de CAPE (0.164-0.174 mM) fueron muy cercanas para ambas reacciones (Tabla 9.12). Esto difiere de lo encontrado por Olguín-Gutiérrez (2010), quien no observó formación de CAPE a partir de un extracto de cascarilla de PC usando una lipasa inmovilizada (Novozym® 435) como catalizador e isooctano como solvente.

El rendimiento de la reacción de transesterificación usando ACL ($37.10 \pm 2.06\%$) y el extracto de PC (34.48 ± 5.58) fue menor a la reportada por Kishimoto *et al.* (2005) para una clorogenato hidrolasa de *A. japonicus* en un sistema bifásico agua-2-FE (rendimiento =

50%) pero mayor a la reportada por Olguín-Gutiérrez (2010) para una clorogenato hidrolasa de *A. ochraceus* en un sistema bifásico agua-diisopropil éter (rendimiento = 9.4%). Las diferencias observadas en el rendimiento pueden estar relacionadas con el origen de la enzima, la pureza de la misma o a las características del sistema de reacción utilizado.

Los resultados encontrados en este capítulo demuestran que es posible producir CAPE a partir del ACL presente en la PC. Esta transformación enzimática es posible usando enzimas comerciales y extractos enzimáticos producidos por FMS. Para llevar a cabo la síntesis enzimática de CAPE, no fue necesaria la purificación total de las enzimas ni los sustratos.

9.6 Conclusiones

En este capítulo se desarrollaron las metodologías para la síntesis enzimática de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación usando enzimas comerciales y extractos enzimáticos crudos como catalizadores.

La lipasa inmovilizada de *C. antarctica* (Novozym® 435) es capaz de catalizar la síntesis de CAPE mediante una reacción de esterificación entre AC y 2-FE en isooctano con buenos rendimientos ($88.74 \pm 8.57\%$), pero no mediante una reacción de transesterificación entre ACL y 2-FE (rendimiento = $0.91 \pm 0.30\%$). La adición de co-solventes más polares que el isooctano mejora la solubilidad del AC, pero no mejora el rendimiento de la reacción.

La síntesis de CAPE en microemulsiones fue posible mediante de esterificación (AC + 2-FE) y transesterificación (ACL + 2-FE) catalizadas por una lipasa (Lipozyme® CALB) y una hemicelulasa comercial (Novozymes NS22002). Las reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por CALB se llevaron a cabo con constantes de reacción muy baja ($k = 0.0025-0.0027 \text{ h}^{-1}$). Las reacciones catalizadas por NS22002 fueron mucho más rápidas (k 8 y 990 veces mayor para las reacciones de esterificación y transesterificación, respectivamente) comparada con las reacciones catalizadas por CALB.

Los extractos enzimáticos producidos por *Aspergillus* spp en FMS son capaces de catalizar síntesis de CAPE mediante reacción de transesterificación (ACL + 2-FE). La reacción de transesterificación del ACL catalizada por la enzima comercial NS22002 y por

extractos con actividad clorogenato hidrolasa es posible usando ACL grado analítico, así como extractos ricos en ACL obtenidos de la PC.

Los rendimientos obtenidos para las reacciones estudiadas tienen rendimiento de bajos a regulares (34-53%). Para mejorar estos rendimientos es necesario realizar una caracterización más detallada de las enzimas y los sistemas de reacción utilizados.

La caracterización cinética de las reacciones establece las bases técnicas y criterios objetivos para el diseño de reactores enzimáticos dedicados a la síntesis de CAPE.

10. Conclusiones generales

En el presente trabajo desarrollamos metodologías para la extracción, purificación y transformación enzimática del ACL de la PC. Se hicieron contribuciones significativas al conocimiento del contenido y distribución de AHCs en este subproducto y se establecieron las condiciones para producir extractos enzimáticos capaces de catalizar la síntesis de CAPE a partir de ACL y 2-FE.

Los AHCs de la PC se encuentran principalmente de la fracción soluble (81-97%). El ACL es el compuesto más abundante en esta fracción y representa del 94 al 99% de los AHCs solubles. El contenido de AHCs en la CP depende de la variedad y el grado de madurez del fruto del que proviene. El mayor contenido de AHCs y ACL lo encontramos en los frutos semi-maduros de las variedades Garnica. Sin embargo, la disponibilidad de estas variedades es limitada. Por ello se prefirió utilizar la PC obtenida de un proceso comercial para la extracción, purificación y transformación enzimática del ACL.

Se diseñó una estrategia para extraer y purificar el ACL de la PC basada en la extracción asistida por microondas (EAM), la cromatografía en Amberlita XAD 16 y HPLC semi-preparativo usando una columna C18. La EAM permite una alta recuperación del ACL de la PC (71.6% del ACL total) en un corto tiempo de extracción (4 min) mediante un proceso sencillo, reproducible y sin utilizar solventes tóxicos. La metodología diseñada para la purificación conduce a la obtención un extracto rico en ACL con una pureza del 61.7%.

Se identificaron 9 cepas de *Aspergillus* spp capaces de producir enzimas con actividad clorogenato hidrolasa en un sistema de FMS con extracto de café verde como fuente de carbono y de inductores. Se observaron diferencias en los perfiles de producción de CO₂, consumo de ACL, acumulación de productos de la hidrólisis del ACL y producción de actividad clorogenato hidrolasa durante la FMS con las diferentes cepas fúngicas. De acuerdo con el modelo de Luedeking-Piret, la producción de la actividad clorogenato hidrolasa de las 9 cepas está asociada al crecimiento ($\alpha > 0$). Los parámetros calculados con este modelo permitieron dividir a las cepas en dos grupos. En el primero (cepas de *A. japonicus* y *A. niger*) el parámetro β fue despreciable. En el segundo grupo (cepas de *A. awamori*, *A. oryzae* y *A.*

tamaritii) el parámetro β fue negativo, lo que indica un decaimiento de la actividad enzimática. Para fines prácticos, las cepas del grupo 1 son preferibles.

Finalmente se estudió la síntesis enzimática de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación usando enzimas comerciales y extractos enzimáticos crudos como catalizadores. Se realizó la caracterización cinética de las reacciones estableciendo así las bases técnicas y criterios objetivos para el diseño de reactores enzimáticos dedicados a la síntesis de CAPE.

La lipasa inmovilizada de *C. antarctica* (Novozym® 435) es capaz de catalizar la síntesis de CAPE mediante una reacción de esterificación entre AC y 2-FE (83.28-88.74%) usando isooctano como solvente, pero no por transesterificación entre ACL y 2-FE (rendimiento = $0.91 \pm 0.30\%$). Las reacciones de esterificación (AC + 2-FE) y transesterificación (ACL + 2-FE) catalizadas por la hemicelulasa NS22002 en microemulsiones fueron mucho más rápidas (k 8 y 990 veces mayor para las reacciones de esterificación y transesterificación, respectivamente) comparada con las reacciones catalizadas por CALB.

La reacción de transesterificación del ACL catalizada por la enzima comercial NS22002 y por extractos con actividad clorogenato hidrolasa es posible usando ACL grado analítico y como extractos ricos en ACL obtenidos de la PC. Los rendimientos obtenidos usando un extracto enzimático concentrado de *A japonicus* AN5 (34.48-37.10%) son menores a los obtenidos con la enzima comercial NS22002 (47.31-53.57%), pero mayores a los reportados en la literatura para una clorogenato hidrolasa de *A. ochraceus* (9.4%). Para mejorar estos rendimientos es necesario realizar una caracterización más detallada de las enzimas y los sistemas de reacción utilizados.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que es posible obtener CAPE a partir del ACL presente en la PC mediante procesos de separación, fermentación y síntesis enzimática. La metodología propuesta puede servir para dar un valor agregado a un subproducto agroindustrial abundante en nuestro país y que actualmente se encuentra subutilizado (PC). Sin embargo, se requiere de mayor investigación para optimizar estos procesos y hacerlos económicamente más atractivos

11. Referencias

- Adachi, O., Ano, Y., Akakabe, Y., Shinagawa, E. & Matsushita, K. (2008). Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81: 143-151.
- Adlercreutz, P. (2013). Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chemical Society Reviews* 42: 6406-6436.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela-Torres, E. & Viniegra-González, G. (2001). Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26: 296-302.
- Aranda, E., Duran, L. & Escamilla, E. (2004). Vermicomposting in coffee cultivation. En: *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*, J.N. Wintgens (Ed.), Wiley-VCH Verlag GmbH. Weinheim, Germany, pp. 324-338.
- Arellano-González, M.A., Ramírez-Coronel, M.A., Torres-Mancera, M.T., Pérez-Morales, G.G. & Saucedo-Castañeda, G. (2011). Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. *Food Technology and Biotechnology* 49: 374-378.
- Aristizábal-Torres, I.D., Carvajal-Herrera, J.J. & Oliveros-Tascón, C.E. (2012). Physical and mechanical properties correlation of coffee fruit (*Coffea arabica*) during its ripening. *Dyna* 79: 148-155.
- Asther, M., Estrada Alvarado, M.I., Haon, M., Navarro, D., Asther, M., Lesage-Meessen, L. & Record, E. (2005). Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Biotechnology* 115: 47-56.
- Asther, M., Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delattre, M., Lesage-Meessen, L., Labat, M. & Asther, M. (2002). Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry* 38: 685-691.
- Awolumate, E. (1983). Chemical composition and potential uses of processing wastes from some Nigerian cash crops. *Turrialba* 33: 381.
- Barbe, C. & Dubourdieu, D. (1998). Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78: 471-478.
- Barco, A., Benetti, S., Risi, C.D., Marchetti, P., Pollini, G.P. & Zanirato, V. (1997). D-(−)-Quinic acid: a chiron store for natural product synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry* 8: 3515-3545.
- Benoit, I., Asther, M., Bourne, Y., Navarro, D., Canaan, S., Lesage-Meessen, L., Herweijer, M., Pedro M. Coutinho, Asther, M. & Record, E. (2007). Gene overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 5624-5632.
- Benoit, I., Navarro, D., Marnet, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J.C. & Asther, M. (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Research* 341: 1820-1827.

- Birath, K. (2007). *Biogas in Captive Fleets*. DG Research European Commission, Estocolmo, Suecia.
- Boccas, F., Roussos, S., Gutierrez, M., Serrano, L. & Viniegra, G.G. (1994). Production of pectinase from coffee pulp in solid state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple three-step screening technique. *Journal of Food Science and Technology* 31: 22-26.
- Bonnina, E., Brunel, M., Gouy, Y., Lesage-Meessen, L., Asther, M. & Thibault, J.F. (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.
- Bradoo, S., Gupta, R. & Saxena, R.K. (1996). Screening of extracellular tannase-producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay. *The Journal of General and Applied Microbiology* 42: 325-329.
- Bressani, R. (1979a). The by-products of coffee berries. En: *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*, J.E. Braham, R. Bressani (Eds.), International Development Research Centre. Ottawa, Canadá, pp. 5-10.
- Bressani, R. (1979b). Potential uses of coffee-berry by-products. En: *Coffee pulp: composition, technology, and utilization*, J.E. Braham, R. Bressani (Eds.), International Development Research Centre. Ottawa, Canadá, pp. 17-24.
- Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, A., Sepúlveda, L., De la Cruz, R., Prado-Barragán, A., Aguilar-González, M.A., Rodríguez, R. & Aguilar, C.N. (2014). Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation. *Food and Bioprocess Processing* 92: 376-382.
- Bulanon, D.M., Kataoka, T., Ota, Y. & Hiroma, T. (2002). A color model for recognition of apples by a robotic harvesting system. *Journal of the Japanese Society of Agricultural Machinery* 64: 123-123.
- Calzada, J.F., León, O.R., Arriola, M.C., Micheo, F., Rolz, C., León, R. & Menchú, J.F. (1981). Biogas from coffee pulp. *Biotechnology Letters* 3: 713-716.
- Cárdenas, S.I. (2007). Caracterización morfológica y agronómica del grupo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Carvajal-Herrera, J.J., Aristizábal-Torres, I.D. & Oliveros-Tascón, C.E. (2012). Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas del fruto de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia) durante su desarrollo y maduración. *Dyna* 79: 116-124.
- Carvajal-Herrera, J.J., Aristizábal-Torres, I.D., Oliveros-Tascón, C.E. & Mejía-Montoya, J.W. (2011). Colorimetría del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante su desarrollo y maduración. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 64: 6229-6240.
- Carvalho, C.M.L. & Cabral, J.M.S. (2000). Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* 82: 1063-1085.
- Catchpole, O., Mitchell, K., Bloor, S., Davis, P. & Suddes, A. (2015). Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia* 106: 167-174.
- Clifford, M.N. & Ramirez-Martinez, J.R. (1991a). Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry* 40: 35-42.
- Clifford, M.N. & Ramirez-Martinez, J.R. (1991b). Tannins in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chemistry* 40: 191-200.

- Couteau, D., McCartney, A.L., Gibson, G.R., Williamson, G. & Faulds, C.B. (2001). Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *Journal of Applied Microbiology* 90: 873-881.
- Couto, J., Karboune, S. & Mathew, R. (2010). Regioselective synthesis of feruloylated glycosides using the feruloyl esterases expressed in selected commercial multi-enzymatic preparations as biocatalysts. *Biocatalysis and Biotransformation* 28: 235-244.
- Couto, J., St-Louis, R. & Karboune, S. (2011). Optimization of feruloyl esterase-catalyzed synthesis of feruloylated oligosaccharides by response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 73: 53-62.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B. & Connerton, I.F. (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63: 647-652.
- Crozier, A., Jaganath, I.B. & Clifford, M.N. (2006). Phenols, polyphenols and tannins: An overview. En: *Plant Secondary Metabolites*, Blackwell Publishing Ltd, pp. 1-24.
- Chen, H.-C., Ju, H.-Y., Twu, Y.-K., Chen, J.-H., Chang, C.-M.J., Liu, Y.-C., Chang, C. & Shieh, C.-J. (2010). Optimized enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester by RSM. *New Biotechnology* 27: 89-93.
- Chen, H.C., Chen, J.H., Chang, C. & Shieh, C.J. (2011a). Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 18: 455-459.
- Chen, H.C., Kuo, C.H., Twu, Y.K., Chen, J.H., Chang, C.M.J., Liu, Y.C. & Shieh, C.J. (2011b). A continuous ultrasound-assisted packed-bed bioreactor for the lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 86: 1289-1294.
- Chen, J.H., Shao, Y., Huang, M.T., Chin, C.K. & Ho, C.T. (1996). Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Cancer Letters* 108: 211-214.
- Chen, W.K., Tsai, C.F., Liao, P.H., Kuo, S.C. & Lee, Y.J. (1999). Synthesis of caffeic acid esters as antioxidants by esterification via acyl chlorides. *Chinese Pharmaceutical Journal* 51: 271-278.
- Chen, Y., Jimmy Yu, Q., Li, X., Luo, Y. & Liu, H. (2007). Extraction and HPLC characterization of chlorogenic acid from tobacco residuals. *Separation Science and Technology* 42: 3481-3492.
- De Azevedo, A.B.A., Mazzafera, P., Mohamed, R.S., Vieira de Melo, S.A.B. & Kieckbusch, T.G. (2008). Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 25: 543-552.
- De Castro, R.D. & Marraccini, P. (2006). Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 175-199.
- De Colmenares, N.G., Ramírez-Martínez, J.R., Aldana, J.O. & Clifford, M.N. (1994). Analysis of proanthocyanidins in coffee pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65: 157-162.
- de la Cruz, R., Ascacio, J.A., Buenrostro, J., Sepúlveda, L., Rodríguez, R., Prado-Barragán, A., Contreras, J.C., Aguilera, A. & Aguilar, C.N. (2015). Optimization of ellagitannase production by *Aspergillus niger* GH1 by solid-state fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 45: 617-631.
- Demestre, M., Messerli, S.M., Celli, N., Shahhossini, M., Kluwe, L., Mautner, V. & Maruta, H. (2009). CAPE (Caffeic acid phenethyl ester)-based propolis extract (Bio 30)

- suppresses the growth of human neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytotherapy Research* 23: 226-230.
- Donkoh, A., Atuahene, C.C., Kese, A.G. & Mensah-Asante, B. (1988). The nutritional value of dried coffee pulp (DCP) in broiler chickens' diets. *Animal Feed Science and Technology* 22: 139-146.
- Du, Y. (2015). Treatment of neurodegenerative and cardiovascular disorders. United States Patent No. US8575215 B2.
- Elias, L.G. (1979). Chemical composition of coffee-berry by-products. En: *Coffee Pulp: Composition, Technology, and Utilization*, J.E. Braham, R. Bressani (Eds.), International Development Research Centre. Ottawa, Canada, pp. 11-16.
- Esquivel, P. & Jiménez, V.M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* 46: 488-495.
- Farah, A. & Donangelo, C.M. (2006). Phenolic compounds in coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 23-36.
- Faulds, C., Sancho, A. & Bartolomé, B. (2002). Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 489-494.
- Faulds, C.B. & Williamson, G. (1993). Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 17: 349-359.
- Faulds, C.B. & Williamson, G. (1994). Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology* 140: 779-787.
- Figuerola-Espinoza, M.-C. & Villeneuve, P. (2005). Phenolic acids enzymatic lipophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 2779-2787.
- Geromel, C., Ferreira, L.P., Cavalari, A.A., Pereira, L.F.P., Guerreiro, S.M.C., Vieira, L.G.E., Leroy, T., Mazzafera, P. & Marraccini, P. (2004). Sugar metabolism during coffee fruit development. *20th International Scientific Colloquium on Coffee*, 11-15 October 2004, Bangalore, India. pp. 651-655.
- Giuliani, S., Piana, C., Setti, L., Hochkoepler, A., Pifferi, P.G., Williamson, G. & Faulds, C.B. (2001). Synthesis of pentylferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnology Letters* 23: 325-330.
- Gombert, A.K., Pinto, A.L., Castilho, L.R. & Freire, D.M.G. (1999). Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry* 35: 85-90.
- Gómez-Crespo, M.F. (2001). La actividad cafetalera en México 1989-2000 y perspectivas para el café mexicano. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Gong, Y.-Y., Yin, X., Zhang, H.-M., Wu, M.-C., Tang, C.-D., Wang, J.-Q. & Pang, Q.-F. (2013). Cloning, expression of a feruloyl esterase from *Aspergillus usamii* E001 and its applicability in generating ferulic acid from wheat bran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 40: 1433-1441.
- Gopalan, N., Rodríguez-Duran, L.V., Saucedo-Castaneda, G. & Nampoothiri, K.M. (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresource Technology* 193: 534-544.

- Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E.M., Efros, L., Caldwell, M., Estevez, V. & Nakanishi, K. (1988). Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44: 230-232.
- Gupta, R., Kumari, A., Syal, P. & Singh, Y. (2015). Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research* 57: 40-54.
- Guyot, B., Bosquette, B., Pina, M. & Graille, J. (1997). Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnology Letters* 19: 529-532.
- Ha, S.H., Anh, T.V., Lee, S.H. & Koo, Y.M. (2012). Effect of ionic liquids on enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 35: 235-240.
- Ha, S.H., Van Anh, T. & Koo, Y.M. (2013). Optimization of lipase-catalyzed synthesis of caffeic acid phenethyl ester in ionic liquids by response surface methodology. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36: 799-807.
- Hashimoto, T., Tori, M., Asakawa, Y. & Wollenweber, E. (1988). Synthesis of two allergenic constituents of propolis and poplar bud excretion. *Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of biosciences* 43: 470-472.
- Hatzakis, N.S. & Smonou, I. (2005). Asymmetric transesterification of secondary alcohols catalyzed by feruloyl esterase from *Humicola insolens*. *Bioorganic Chemistry* 33: 325-337.
- Hegde, S. & Muralikrishna, G. (2009). Isolation and partial characterization of alkaline feruloyl esterases from *Aspergillus niger* CFR 1105 grown on wheat bran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 1963-1969.
- Henry, J.P., Oblong, J.E., Sreekrishna, K. & Styczynski, P.B. (2008). Compositions for regulation of hair growth. No. US20080254055 A1.
- Hernández, B., Sáenz, C., Alberdi, C., Alfonso, S., Berroguí, M. & Diñeiro, J.M. (2004). Design and performance of a color chart based in digitally processed images for sensory evaluation of piquillo peppers (*Capsicum annuum*). *Color Research and Application* 29: 305-311.
- Houbron, E., Cano-Hernández, V., Reyes-Alvarado, L.C. & Rustrian, E. (2007). En busca de una solución sustentable para el tratamiento de los desechos del café. *Gaceta de la Universidad Veracruzana* 101.
- Hu, F., Deng, C., Liu, Y. & Zhang, X. (2009). Quantitative determination of chlorogenic acid in Honeysuckle using microwave-assisted extraction followed by nano-LC-ESI mass spectrometry. *Talanta* 77: 1299-1303.
- Hulme, A.C. (1953). The isolation of chlorogenic acid from the apple fruit. *The Biochemical journal* 53: 337-340.
- Jiang, S. & Singh, G. (1998). Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues. *Tetrahedron* 54: 4697-4753.
- Kalvins, I., Ilmars, S., Sestakova, I., Domracova, I., Jascenko, E., Bridane, V. & Kanepe, I. (2012). Composition of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and one of catechin, kaempferol and myricetin for potentiating antitumour effect and for treating tumours European Patent No. EP2420289 A1.
- Kapoor, M. & Gupta, M.N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* 47: 555-569.

- Kishimoto, N., Kakino, Y., Iwai, K. & Fujita, T. (2005). Chlorogenate hydrolase-catalyzed synthesis of hydroxycinnamic acid ester derivatives by transesterification, substitution of bromine, and condensation reactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 198-202.
- Koshiro, Y., Jackson, M., Katahira, R., Wang, M.L., Nagai, C. & Ashihara, H. (2007). Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 62: 731-742.
- Koumenis, C. & Naczki, C. (2004). Method of using caffeic acid phenethyl ester and analogs thereof as radiation sensitizers. United States Patent No. US6689811 B2.
- Krygier, K., Sosulski, F. & Hoggs, L. (1982). Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30: 330-334.
- Kumar, S. & Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal* 2013: 1-16.
- Kurata, A., Takemoto, S., Fujita, T., Iwai, K., Furusawa, M. & Kishimoto, N. (2011). Synthesis of 3-cyclohexylpropyl caffeate from 5-caffeoylquinic acid with consecutive enzymatic conversions in ionic liquid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69: 161-167.
- Larralde-Corona, C.P., López-Isunza, F. & Viniegra-González, G. (1993). Variación de la velocidad de extensión radial de *A. niger* con la concentración inicial de glucosa y la relación C/N. *Biotecnología* 3: 28-33.
- LeBlanc, L., Paré, A., Jean-François, J., Hébert, M., Surette, M. & Touaibia, M. (2012). Synthesis and antiradical/antioxidant activities of caffeic acid phenethyl ester and its related propionic, acetic, and benzoic acid analogues. *Molecules* 17: 14637-14650.
- Lee, S., Lee, Y., Cho, J.-Y., Kim, Y., Lee, S.-H., Kim, W.-S. & Moon, J.-H. (2015). Establishment of a simple method for purification of high purity chlorogenic acid from immature fruit of pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 58: 335-341.
- Lee, Y.J., Liao, P.H., Chen, W.K. & Yang, C.C. (2000). Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Letters* 153: 51-56.
- Levashov, A. & Klyachko, N. (2001). Reverse micellar systems. En: *Enzymes in Nonaqueous Solvents*, E. Vulfsen, P. Halling, H. Holland (Eds.), Vol. 15, Humana Press, pp. 575-586.
- Levasseur, A., Benoit, I., Asther, M., Asther, M. & Record, E. (2004). Homologous expression of the feruloyl esterase B gene from *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification* 37: 126-133.
- Levenspiel, O. (2004). *Ingeniería de las Reacciones Químicas. 3a ed.* Limusa, México, DF.
- Li, H., Chen, B. & Yao, S. (2005). Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrasonics Sonochemistry* 12: 295-300.
- Li, Z., Huang, D., Tang, Z., Deng, C. & Zhang, X. (2010). Fast determination of chlorogenic acid in tobacco residues using microwave-assisted extraction and capillary zone electrophoresis technique. *Talanta* 82: 1181-1185.
- Lin, Y. & Yan, Y. (2012). Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microbial Cell Factories* 11: 42.

- Loera, O. & Viniestra-González, G. (1998). Identification of growth phenotypes in *Aspergillus niger* pectinase over-producing mutants using image analysis procedures. *Biotechnology Techniques* 12: 801-804.
- Lu, H.-T., Jiang, Y. & Chen, F. (2004). Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of chlorogenic acid from *Flos Lonicerae*. *Journal of Chromatography A* 1026: 185-190.
- Luedeking, R. & Piret, E.L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering* 1: 393-412.
- Marín-López, S.M., Arcilla-Pulgarín, J., Montoya-Restrepo, E.C. & Oliveros-Tascón, C.E. (2003). Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café *Coffea arabica* L. var. Colombia. *Cenicafé* 54: 208-225.
- Marques, V. & Farah, A. (2009). Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. *Food Chemistry* 113: 1370-1376.
- Martínez-Carrera, D., Aguilar, A., Martínez, W., Bonilla, M., Morales, P. & Sobal, M. (2000). Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. En: *Coffee Biotechnology and Quality*, T. Sera, C.R. Soccol, A. Pandey, S. Roussos (Eds.), Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands, pp. 471-488.
- Martínez-Carrera, D., Aguilar, A., Martínez, W., Morales, P., Sobal, M., Bonilla, M. & Larque-Saavedra, A. (1998). A sustainable model for rural production of edible mushrooms in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada* 11: 77-96.
- Mata, G., Hernandez, D.M.M. & Andreu, L.G.I. (2005). Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21: 143-150.
- Mateos, J.C., Rivera, M., Arrizon, J., Canales, A. & Sandoval, G. (2009). Enzymes useful in the synthesis of bioactive caffeic acid derivatives: Practical screening and structure-function relationships. En: *New Horizons in Biotechnology*, A. Pandey, C. Larroche, C.R. Soccol, C.-G. Dussap (Eds.), Asiatech Publishers Inc. New Delhi, India, pp. 132-156.
- Matsuo, T., Kobayashi, T., Kimura, Y., Tsuchiyama, M., Oh, T., Sakamoto, T. & Adachi, S. (2008). Synthesis of glyceryl ferulate by immobilized ferulic acid esterase. *Biotechnology Letters* 30: 2151-2156.
- Mazvimba, M.T., Yu, Y., Cui, Z.-Q. & Zhang, Y. (2012). Optimization and orthogonal design of an ultrasonic-assisted aqueous extraction process for extracting chlorogenic acid from dry tobacco leaves. *Chinese Journal of Natural Medicines* 10: 311-320.
- Medeiros, A.B.P., Christen, P., Roussos, S., Gern, J.C. & Soccol, C.R. (2003). Coffee residues as substrates for aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in solid state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology* 34: 245-248.
- Mendoza-Ortiz, I. (2006). Evaluación del potencial eléctrico sobre el metabolismo de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Mexico, DF.
- Miljkovic, D., Duell, B. & Miljkovic, V. (2010). Methods for coffee cherry products. United States Patent No. 7754263.
- Mukherjee, G., Singh, R.K., Mitra, A. & Sen, S.K. (2007). Ferulic acid esterase production by *Streptomyces* sp. *Bioresource Technology* 98: 211-213.

- Murthy, P.S. & Naidu, M.M. (2011). Production and application of xylanase from *Penicillium* sp. Utilizing coffee by-products. *Food and Bioprocess Technology* 5: 657-664.
- Murthy, P.S. & Naidu, M.M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. *Resources, Conservation and Recycling* 66: 45-58.
- Murthy, P.S., Naidu, M.M. & Srinivas, P. (2009). Production of alpha-amylase under solid-state fermentation utilizing coffee waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84: 1246-1249.
- Musisi, A. (2009). Fuel from waste fires up Uganda. *Appropriate Technology* 36: 33-35.
- Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A. & Scaccini, C. (2002). Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry* 79: 119-124.
- Nava, I., Favela-Torres, E. & Saucedo-Castañeda, G. (2011). Effect of mixing on the solid-state fermentation of coffee pulp with *Aspergillus tamaritii*. *Food Technology and Biotechnology* 49: 391-385.
- Niladevi, K.N., Sukumaran, R.K. & Prema, P. (2007). Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34: 665-674.
- Noriaki, K. & Tokio, F. (2004). Anti-influenza virus agent. Japanese Patent No. JP4036327 B2.
- Noriega-Salazar, A., Silva-Acuña, R. & García de Salcedo, M. (2008). Utilización de la pulpa de café en la alimentación animal. *Zootecnia Tropical* 26: 411-419.
- Okamura, S. & Watanabe, M. (1982). Purification and properties of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from *Aspergillus japonicus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 46: 1839-1848.
- Olguín-Gutiérrez, J.S. (2010). Síntesis de ésteres de ácido caféico por vía enzimática. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R. & Roussos, S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 6: 153-162.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Schmeda-Hirschmann, G., Burillo, J. & Codina, C. (2004). Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* mill.) waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1890-1897.
- Peñaloza, W., Molina, M.R., Brenes, R.G. & Bressani, R. (1985). Solid-state fermentation: An alternative to improve the nutritive value of coffee pulp. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 388-393.
- Pérez-Jiménez, J. & Torres, J.L. (2011). Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 12713-12724.
- Pérez-Morales, G.G. (2008). Producción de enzimas tipo feruloil esterasa por fermentación en medio sólido en pulpa de café. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Pérez-Morales, G.G., Ramírez-Coronel, A., Guzmán-López, O., Cruz-Sosa, F., Perraud-Gaime, I., Roussos, S. & Saucedo-Castañeda, G. (2011). Feruloyl esterase activity

- from coffee pulp in solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 49: 352-358.
- Perraud-Gaime, I. & Roussos, S. (1997). Selection of filamentous fungi for decaffeination of coffee pulp in solid state fermentation prior to formation of conidiospores. En: *Advances in Solid State Fermentation*, S. Roussos, B.K. Lonsane, M. Raimbault, G. Viniegra-Gonzalez (Eds.), Springer Dordrecht, the Netherlands, pp. 209-221.
- Pierre, F., Rosell, M., Quiroz, A. & Granda, Y. (2009). Evaluación química y biológica de compost de pulpa del café en caspito municipio Andrés Eloy Blanco, Estado Lara, Venezuela. *Bioagro* 21: 105-110.
- Pirt, S.J. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Puertas-Mejía, M.A., Rivera-Echeverry, F., Villegas-Guzmán, P., Rojano, B.A. & Pelaez-Jaramillo, C. (2012). Comparación entre el estado de maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L.), el contenido de antocianinas y su capacidad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 17: 1-7.
- Raimbault, M. (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1: 26-27.
- Rakotomalala, J.-J. (1992). Diversité biochimique des caféiers: analyse des acides hydroxycinnamiques, bases puriques et diterpènes glycosidiques. particularité des caféiers sauvages de la région malgache (*Mascarocoffea* Chev.). Thèse de Doctorat. Université de Montpellier II. Montpellier, France.
- Ramirez-Coronel, M.A., Marnet, N., Kolli, V.S.K., Roussos, S., Guyot, S. & Augur, C. (2004). Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1344-1349.
- Ramírez-Coronel, M.A., Torres-Mancera, M.T., Augur, C. & Saucedo-Castañeda, G. (2007). Estudio del contenido de ácidos hidroxicinámicos de la pulpa del café para su biotransformación. *Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Morelia, Michoacán, México.
- Ramirez-Martinez, J.R. (1988). Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 43: 135-144.
- Ramírez-Martínez, J.R. (1999). *Pulpa de café ensilada*. Universidad Nacional Experimental del Táchira, San Cristóbal, Venezuela.
- Ramírez, J. (1987). Compuestos fenólicos en la pulpa de café. Cromatografía de papel de pulpa fresca de 12 cultivares de *Coffea arabica* L. *Turrialba* 37: 317-323.
- Ramírez, L., Arrizon, J., Sandoval, G., Cardador, A., Bello-Mendoza, R., Lappe, P. & Mateos-Díaz, J.C. (2008). A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151: 711-723.
- Righelato, R.C., Trinci, A.P.J., Pirt, S.J. & Peat, A. (1968). The influence of maintenance energy and growth rate on the metabolic activity, morphology and conidiation of *Penicillium chrysogenum*. *Microbiology* 50: 399-412.
- Robbins, R.J. (2003). Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2866-2887.
- Rodriguez-Leon, J.A., Soccol, C.R., Pandey, A. & Rodriguez, D.E. (2008). Kinetics of solid-state fermentation. En: *Current Developments in Solid-state Fermentation*, A. Pandey, C. Soccol, C. Larroche (Eds.), Springer. New York, USA, pp. 48-73.

- Salihu, A. & Alam, M.Z. (2015). Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochemistry* 50: 86-96.
- Sandoval-Niño, Z.L. & Prieto-Ortiz, F.A. (2007). Caracterización de café cereza empleando técnicas de visión artificial. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 60: 4105-4127.
- Scalbert, A. & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition* 130: 2073S-2085S.
- Schieber, A., Hilt, P., Streker, P., Endreß, H.-U., Rentschler, C. & Carle, R. (2003). A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4: 99-107.
- Schöbel, B. & Pollmann, W. (1980). Isolation and characterization of a chlorogenic acid esterase from *Aspergillus niger*. *Zeitschrift für Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 35: 209-212.
- Seeram, N., Lee, R., Hardy, M. & Heber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology* 41: 49-55.
- Segel, I.H. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Sharma, S. & Kanwar, S.S. (2014). Organic solvent tolerant lipases and applications. *The Scientific World Journal* 2014: 15.
- Shenoy, D., Pai, A., Vikas, R.K., Neeraja, H.S., Deeksha, J.S., Nayak, C. & Rao, C.V. (2011). A study on bioethanol production from cashew apple pulp and coffee pulp waste. *Biomass and Bioenergy* 35: 4107-4111.
- Shimizu, Y. & Li, B. (2005). Purification of water-soluble natural products. En: *Natural Products Isolation*, S.D. Sarker, Z. Latif, A.I. Gray (Eds.), Humana Press. Totowa, NJ, pp. 415-438.
- Shin, H.D. & Chen, R.R. (2006). Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 478-485.
- Shin, S.H., Lee, K.W. & Lee, H.J. (2012). Food composition for obesity prevention or pharmaceutical composition for obesity treatment containing caffeic acid phenethyl ester. Korean Patent No. KR101168050 B1.
- SIAP (2015). *Cierre de la producción agrícola por cultivo* Secretaría de Agricultura Ganadería y Recursos Pecuarios, México, D.F.
- SIAP (2005). *Plan rector del sistema producto café en México*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Pecuarios, México, D.F.
- Silva, D., Tokuioshi, K., da Silva Martins, E., Da Silva, R. & Gomes, E. (2005). Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3. *Process Biochemistry* 40: 2885-2889.
- Smith, M.A., Weaver, V.B., Young, D.M. & Ornston, L.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.
- Sobal, M., Martinez-Carrera, D., Rio, B. & Roussos, S. (2003). Screening of edible mushrooms for polyphenol degradation and tannase production from coffee pulp and coffee husk. En: *New Horizons in Biotechnology*, S. Roussos, C.R. Soccol, A.

- Pandey, C. Augur (Eds.), Kluwer Academic Press. Dordrecht, The Netherlands, pp. 89-95.
- Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E. & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnology Progress* 18: 193-200.
- Stamatis, H., Sereti, V. & Kolisis, F.N. (1999). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76: 1505-1510.
- Stevenson, D.E., Parkar, S.G., Zhang, J., Stanley, R.A., Jensen, D.J. & Cooney, J.M. (2007). Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). *Enzyme and Microbial Technology* 40: 1078-1086.
- Stonans, I., Kalvins, I. & Sestakova, I. (2011). Pharmaceutical combination of 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil and caffeic acid phenethyl ester for oral treating of tumors. European Patent No. EP2331091 A1.
- Sun, L., Guo, Y., Fu, C., Li, J. & Li, Z. (2013). Simultaneous separation and purification of total polyphenols, chlorogenic acid and phlorizin from thinned young apples. *Food Chemistry* 136: 1022-1029.
- Tolba, M.F., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Rahman, S.Z. & Abdel-Naim, A.B. (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* 65: 699-709.
- Tomás-Barberán, F.A., Blázquez, M.A., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F. & Tomás-Lorente, F. (1992). A comparative study of different amberlite XAD resins in flavonoid analysis. *Phytochemical Analysis* 3: 178-181.
- Topakas, E., Vafiadi, C. & Christakopoulos, P. (2007). Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochemistry* 42: 497-509.
- Topakas, E., Vafiadi, C., Stamatis, H. & Christakopoulos, P. (2005). *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 36: 729-736.
- Torres-Mancera, M.T. (2013). Extracción enzimática de ácido clorogénico de la pulpa de café. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Torres-Mancera, M.T., Baqueiro-Peña, I., Figueroa-Montero, A., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Favela-Torres, E. & Saucedo-Castañeda, G. (2013). Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnology Progress* 29: 337-345.
- Torres-Mancera, M.T., Cordova-López, J., Rodríguez-Serrano, G., Roussos, S., Ramírez-Coronel, M.A., Favela-Torres, E. & Saucedo-Castañeda, G. (2011). Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technology and Biotechnology* 49: 369-373.
- Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M., Di Luccio, M. & Oliveira, J.V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology* 3: 182-196.
- Tsuchiyama, M., Sakamoto, T., Tanimori, S., Murata, S. & Kawasaki, H. (2007). Enzymatic synthesis of hydroxycinnamic acid glycerol esters using type A feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 71: 2606-2609.

- Ulloa, J.B., van Weerd, J.H., Huisman, E.A. & Verreth, J.A.J. (2004). Tropical agricultural residues and their potential uses in fish feeds: the Costa Rican situation. *Waste Management* 24: 87-97.
- Ulloa Rojas, J.B., Verreth, J.A.J., van Weerd, J.H. & Huisman, E.A. (2002). Effect of different chemical treatments on nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Animal Feed Science and Technology* 99: 195-204.
- Upadhyay, R. & Mohan Rao, L.J. (2013). An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53: 968-984.
- Upadhyay, R., Ramalakshmi, K. & Jagan Mohan Rao, L. (2012). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acids from green coffee beans. *Food Chemistry* 130: 184-188.
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benitez, J.A. & Hernandez-Santiago, C. (2010). Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 14: 2147-2153.
- Watanabe, M.A.E., Amarante, M.K., Conti, B.J. & Sforcin, J.M. (2011). Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63: 1378-1386.
- Widjaja, A., Yeh, T.-H. & Ju, Y.-H. (2008). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 39: 413-418.
- Wilbaux, R. (1956). *Les caféiers au Congo Belge. Technologie du café Arabica et Robusta*. Direction de l'Agriculture des Forêts et de l'Élevage, Bruselas, Bélgica.
- Yang, C.C. (2002). Anti-retroviral pharmaceutical compositions. European Patent No. EP1166782 A2.
- Yasuhiro, M. (2009). Skin care preparation. Japanese Patent No. JP4212052 B2.
- Ye, S., Zhu, R., Yang, Q. & Zhou, Y. (2012). Method for preparing caffeic acid phenethyl ester (*in chinese*). Chinese Patent No. 102746152 A.
- Yoshimoto, M., Kurata-Azuma, R., Fujii, M., Hou, D.-X., Ikeda, K., Yoshidome, T. & Osako, M. (2005). Enzymatic production of caffeic acid by koji from plant resources containing caffeoylquinic acid derivatives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69: 1777-1781.
- Zhang, B., Yang, R. & Liu, C.-Z. (2008a). Microwave-assisted extraction of chlorogenic acid from flower buds of *Lonicera japonica* Thunb. *Separation and Purification Technology* 62: 480-483.
- Zhang, B., Yang, R., Zhao, Y. & Liu, C.-Z. (2008b). Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins. *Journal of Chromatography B* 867: 253-258.
- Zhang, P., Tang, Y., Li, N.-G., Zhu, Y. & Duan, J.-A. (2014). Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. *Molecules* 19: 16458.
- Zheng, H.-z., Hwang, I.-W. & Chung, S.-K. (2009). Enhancing polyphenol extraction from unripe apples by carbohydrate-hydrolyzing enzymes. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 10: 912-919.
- Zhou, M., Huang, Z., Zhou, B., Luo, Y., Jia, G., Liu, G., Zhao, H. & Chen, X. (2015). Construction and expression of two-copy engineered yeast of feruloyl esterase. *Electronic Journal of Biotechnology* 18: 338-342.

Zuluaga-Vasco, J. (1989). Utilización integral de los subproductos del café. *Memorias del I Seminario Internacional sobre Biotecnología en la Agroindustria Cafetalera*, Xalapa, Veracruz. Instituto Mexicano del Café. pp. 63-73.

12. Anexos

Anexo 1. Modelos usados para la estimación de parámetros cinéticos de la FMS

Tabla A1.1 Modelos utilizados para describir el crecimiento, consumo de sustrato y formación de producto

Modelo	Forma diferencial	Forma integral
Logístico	$\frac{dCO_2}{dt} = \mu_{CO_2} \cdot CO_2 \left(1 - \frac{CO_2}{CO_{2max}} \right)$	$CO_2 = \frac{CO_{2max}}{1 + \left(\frac{CO_{2max}}{CO_{20}} - 1 \right) \exp^{-\left(\mu_{CO_2} t \right)}}$
Pirt	$-\frac{dO_2}{dt} = \frac{1}{Y_{CO_2/O_2}} \frac{dCO_2}{dt} + m_{O_2} \cdot CO_2$	$O_2 = O_{20} - \frac{1}{Y_{CO_2/O_2}} (CO_2 - CO_{20}) - m_{O_2} \frac{CO_{2max}}{\mu_{CO_2}} \ln \left(\frac{CO_{2max} - CO_{20}}{CO_{2max} - CO_2} \right)$
Luedeking-Piret	$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dCO_2}{dt} + \beta CO_2$	$P = P_0 + \alpha (CO_2 - CO_{20}) - \beta \frac{CO_{2max}}{\mu_{CO_2}} \ln \left(\frac{CO_{2max} - CO_{20}}{CO_{2max} - CO_2} \right)$

En donde:

dCO_2/dt	=	Tasa de producción de CO_2
μ_{CO_2}	=	Tasa específica de producción de CO_2
CO_2	=	Producción acumulada de CO_2
CO_{2max}	=	Máxima producción de CO_2
CO_{20}	=	CO_2 producido cuando $t = 0$
dO_2/dt	=	Tasa de consumo de O_2
Y_{CO_2/O_2}	=	Rendimiento respiratorio asociado al crecimiento
m_{O_2}	=	Coefficiente de consumo de O_2 no asociado al crecimiento
O_{20}	=	O_2 consumido cuando $t = 0$
dP/dt	=	Tasa de formación de producto
α	=	Coefficiente asociado al crecimiento
β	=	Coefficiente no asociado al crecimiento
P_0	=	Concentración del producto cuando $t = 0$

Anexo 2. Material suplementario del capítulo 8

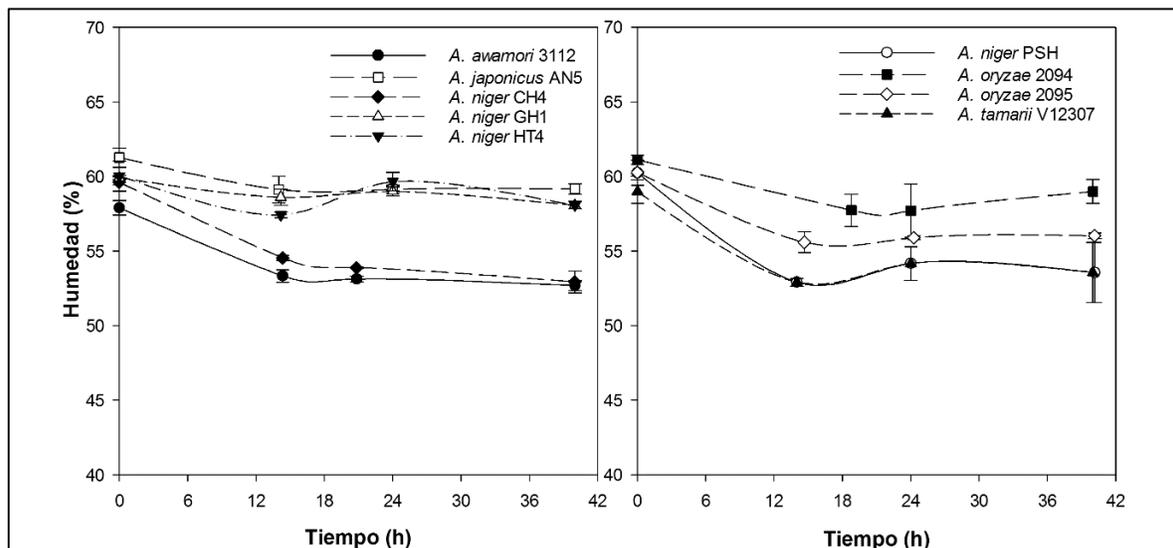


Figura A2.1 Cambios en la humedad durante la FMS en columnas.

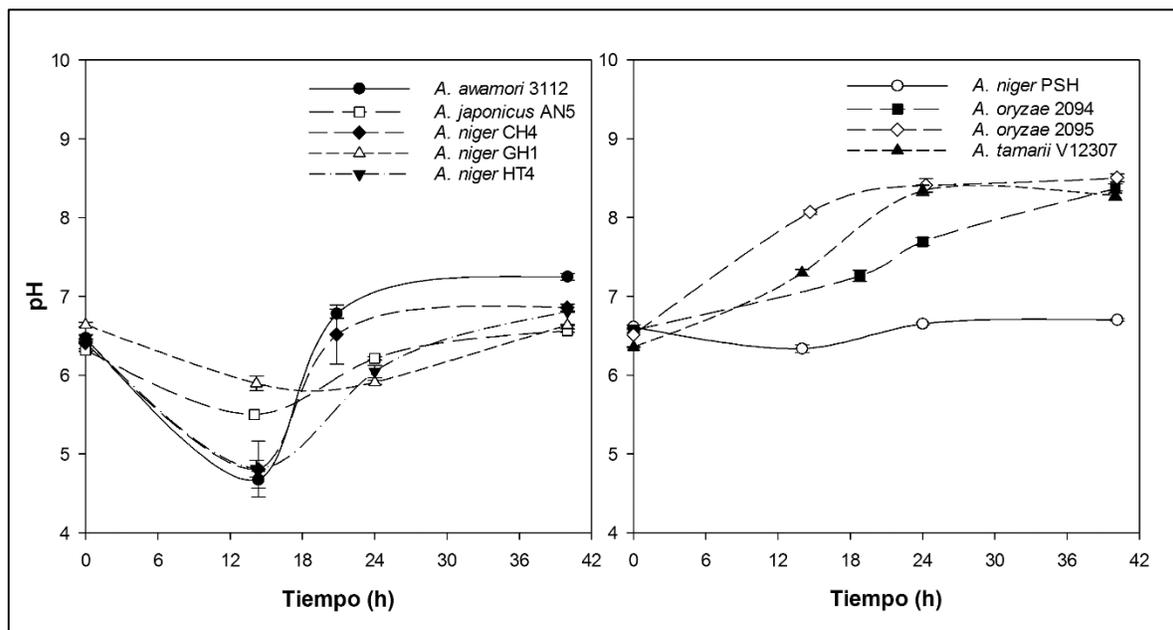


Figura A2.2 Evolución del pH durante la FMS en columnas.

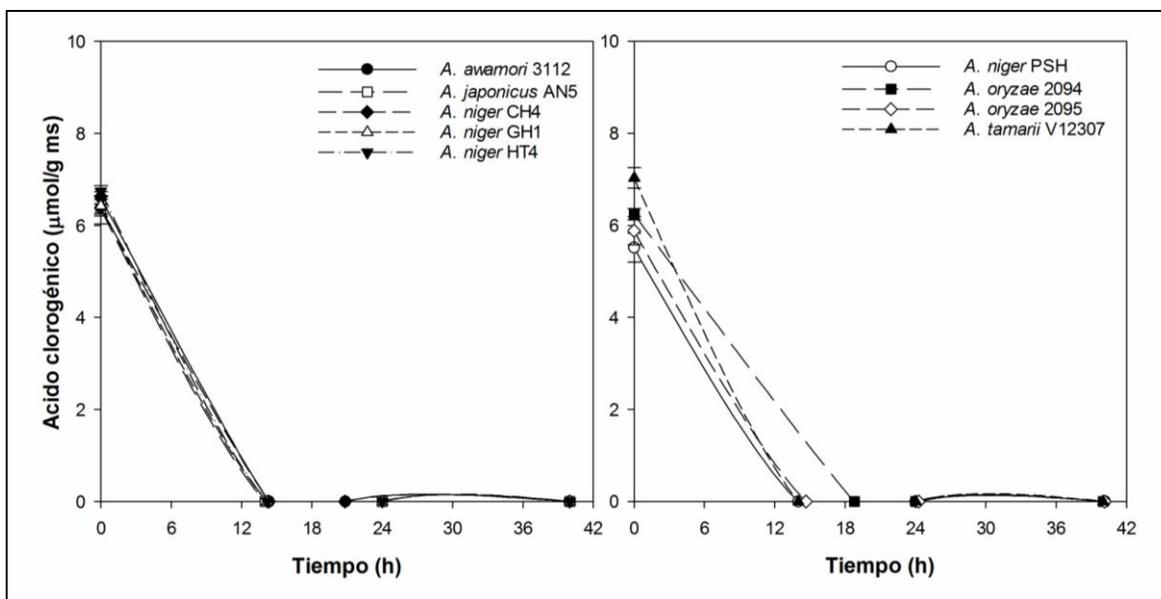


Figura A2.3 Consumo de ACL durante la FMS en columnas.

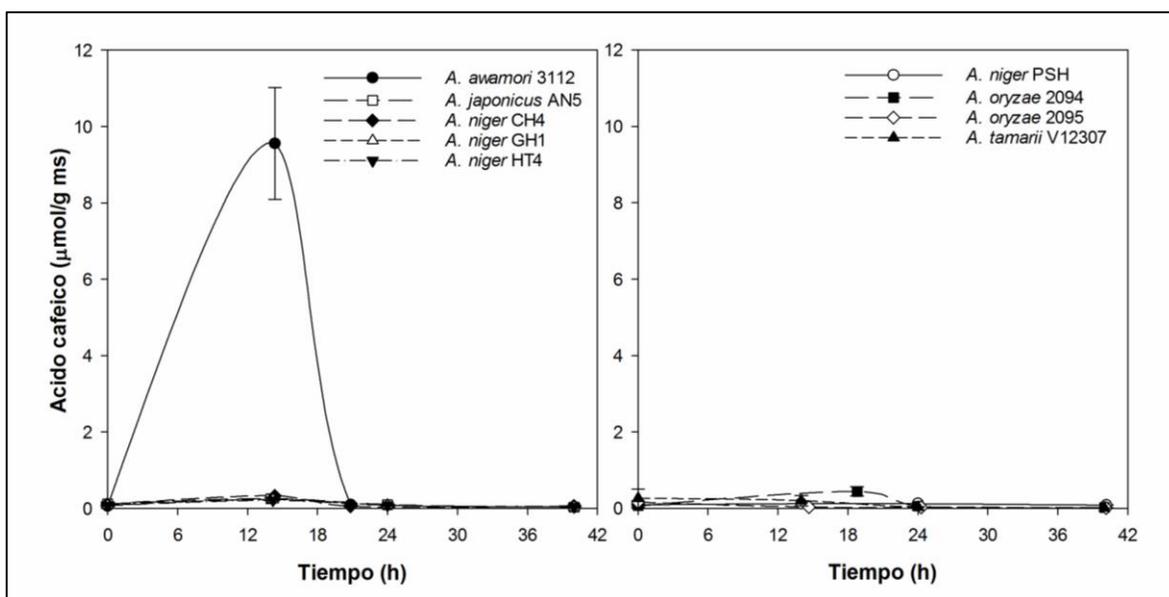


Figura A2.4 Evolución del AC durante la FMS en columnas.

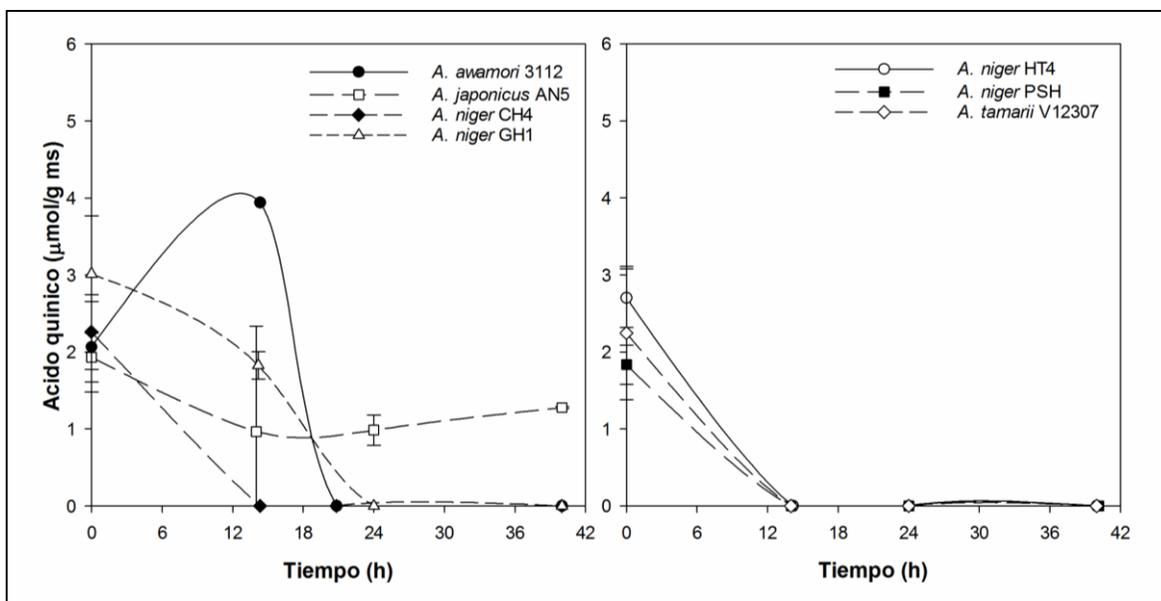


Figura A2.5 Evolución del AQ durante la FMS en columnas.

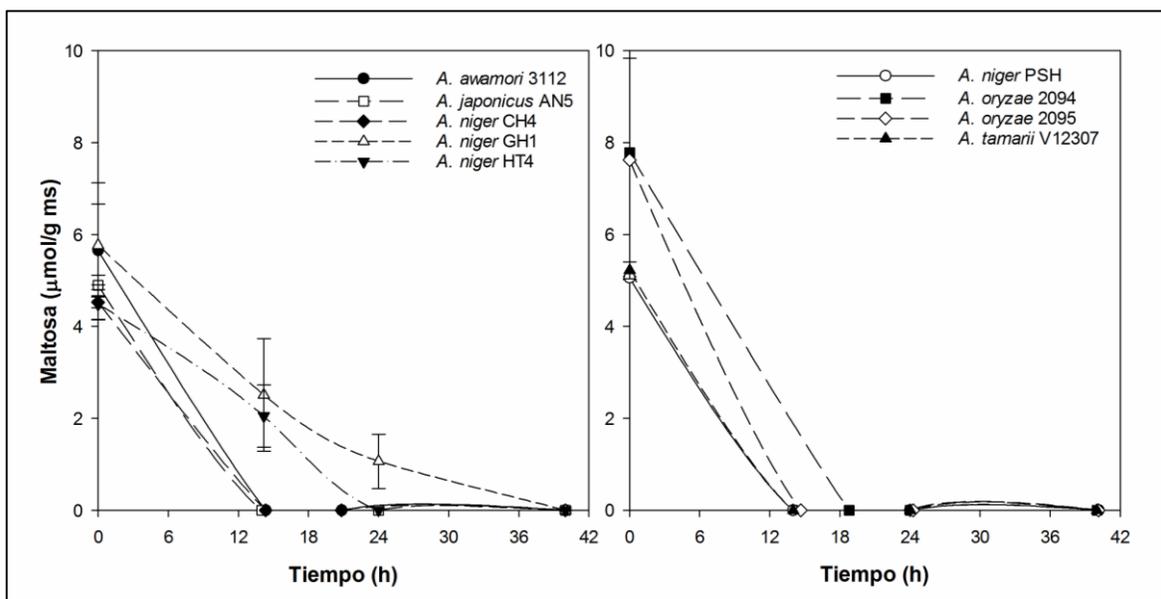


Figura A2.6 Consumo de maltosa durante la FMS en columnas.

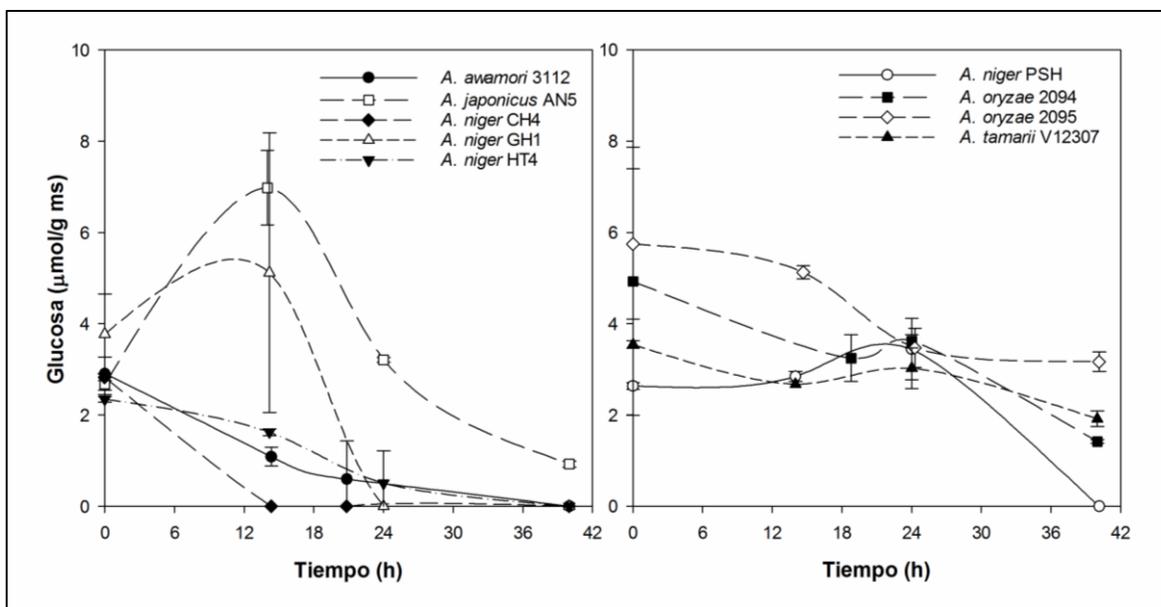


Figura A2.7 Evolución de la concentración de glucosa durante la FMS en columnas.

Anexo 3. Parámetros estimados para la simulación de las reacciones enzimáticas

Tabla A3.1 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación catalizadas por Novozym® 435 en isooctano (Figura 9.4).

Sustrato	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
AC	0.0175					0.0000	0.0004
ACL	0.0004	0.0081	0.0568	0.0525	3.1029	0.0000	0.0004

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden.

Tabla A3.2 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis de CAPE mediante una reacción esterificación catalizada por Novozym® 435 en diferentes sistemas de solventes (Figura 9.5).

Solvente	k_1 (h ⁻¹)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
Isooctano	0.0175	3.5030	0.0015
Isooctano + THF	0.0167	1.7177	0.0750
Isooctano + acetona	0.0069	1.8171	0.0504
Terbutanol	0.0020	2.1584	0.0227
Terbutanol + DMSO	0.0027	2.6624	0.0178
Terbutanol + DMF	0.0015	2.1700	0.0207

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden.

Tabla A3.3 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación en microemulsiones (Figura 9.6).

Enzima	Sustrato	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
CALB	AC	0.0025					0.2339	0.0000
CALB	ACL	0.0027	0.0108	0.0177	0.0614	0.2363	0.0000	0.0000
NS22002	AC	0.0198					0.2621	0.0129
NS22002	ACL	2.7178	0.0000	0.0000	0.0058	0.0867	0.1141	0.0684

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden.

Tabla A3.4 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis enzimática de CAPE por transesterificación en microemulsiones a diferentes temperaturas (Figuras 9.7a y A4.1).

Temperatura (°C)	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
30	0.365	0.001	0.061	0.000	0.167	0.021	0.022
40	0.746	0.090	0.024	0.000	0.134	0.042	0.037
50	1.010	0.136	0.247	0.015	0.196	0.014	0.014
60	0.577	0.004	0.199	0.000	0.153	0.020	0.022
70	0.540	0.233	0.106	0.087	0.113	0.024	0.018

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden (reacciones en paralelo).

Tabla A3.5 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis enzimática de CAPE por transesterificación en microemulsiones a diferentes valores de pH (Figuras 9.7b y A4.2).

pH	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
4	0.559	0.244	0.106	0.086	0.195	0.008	0.007
5	1.320	0.112	0.389	0.006	0.177	0.016	0.020
6	1.389	0.000	0.513	0.000	0.159	0.023	0.028
7	2.881	0.002	0.331	0.000	0.086	0.064	0.059
8	2.539	0.314	0.757	0.040	0.101	0.052	0.069

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden (reacciones en paralelo).

Tabla A3.6 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis enzimática de CAPE por transesterificación en microemulsiones a diferentes valores de w_0 (Figuras 9.8a y A4.3).

w_0	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
5	0.942	0.096	0.321	0.071	0.114	0.003	0.010
10	1.389	0.000	0.513	0.000	0.159	0.023	0.028
15	2.496	0.000	0.850	0.000	0.216	0.050	0.058
20	4.513	0.001	0.006	0.000	0.188	0.144	0.089

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden (reacciones en paralelo).

Tabla A3.7 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis enzimática de CAPE por transesterificación en microemulsiones a diferentes concentraciones de AOT (Figuras 9.8b y A4.4).

Conc. AOT (mM)	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
100	0.942	0.096	0.321	0.071	0.114	0.003	0.010
200	1.218	0.000	0.465	0.000	0.107	0.049	0.071
300	1.931	0.003	0.333	0.000	0.165	0.077	0.071
400	1.443	0.000	0.480	0.004	0.225	0.075	0.071

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden (reacciones en paralelo).

Tabla A3.8 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por NS22002 usando ACL y extracto de PC como sustrato (Figura 9.9)

Sustrato	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
ACL	6.492	0.606	0.057	0.000	0.157	0.154	0.101
Extracto de PC	3.148	0.002	0.784	0.000	0.146	0.118	0.106

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden (reacciones en paralelo).

Tabla A3.9 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos de *Aspergillus* spp. (Figuras 9.10 y A4.5).

Extracto enzimático	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
<i>A. awamori</i> 3112	269.007	8.305	0.022	0.387	0.366	0.079	0.000
<i>A. japonicus</i> AN5	258.055	6.368	0.027	0.171	0.324	0.119	0.006
<i>A. niger</i> CH4	260.787	12.610	0.043	0.872	0.369	0.070	0.001
<i>A. niger</i> GH1	277.205	0.000	0.036	0.646	0.299	0.134	0.001
<i>A. niger</i> HT4	76.870	1.904	0.022	0.416	0.402	0.035	0.000
<i>A. niger</i> PSH	272.551	4.533	0.024	0.414	0.316	0.107	0.000
<i>A. oryzae</i> 2094	80.297	2.238	0.048	0.301	0.421	-0.006	0.000
<i>A. oryzae</i> 2095	15.073	0.315	0.013	0.193	0.424	-0.004	0.000
<i>A. tamarisii</i> V12307	277.239	0.076	0.012	0.121	0.424	0.024	0.000

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden (reacciones en serie).

Tabla A3.10 Parámetros utilizados para el modelamiento de la síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por un extracto enzimático concentrado de *A. japonicus* AN5 usando ACL y extracto de PC como sustrato (Figura 9.11)

Sustrato	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	k_3 (h ⁻¹)	k_4 (h ⁻¹)	ACL_0 (mM)	AC_0 (mM)	$CAPE_0$ (mM)
ACL	238.192	6.145	0.083	0.093	0.026	0.385	0.009
Extracto de PC	62.073	0.131	0.079	0.100	0.037	0.360	0.007

* $CAPE_0$ corresponde al valor observado de CAPE cuando $t = 0$. Los demás parámetros se estimaron usando un modelo de pseudo primer orden (reacciones en serie).

Anexo 4. Simulación de las reacciones enzimáticas estudiadas

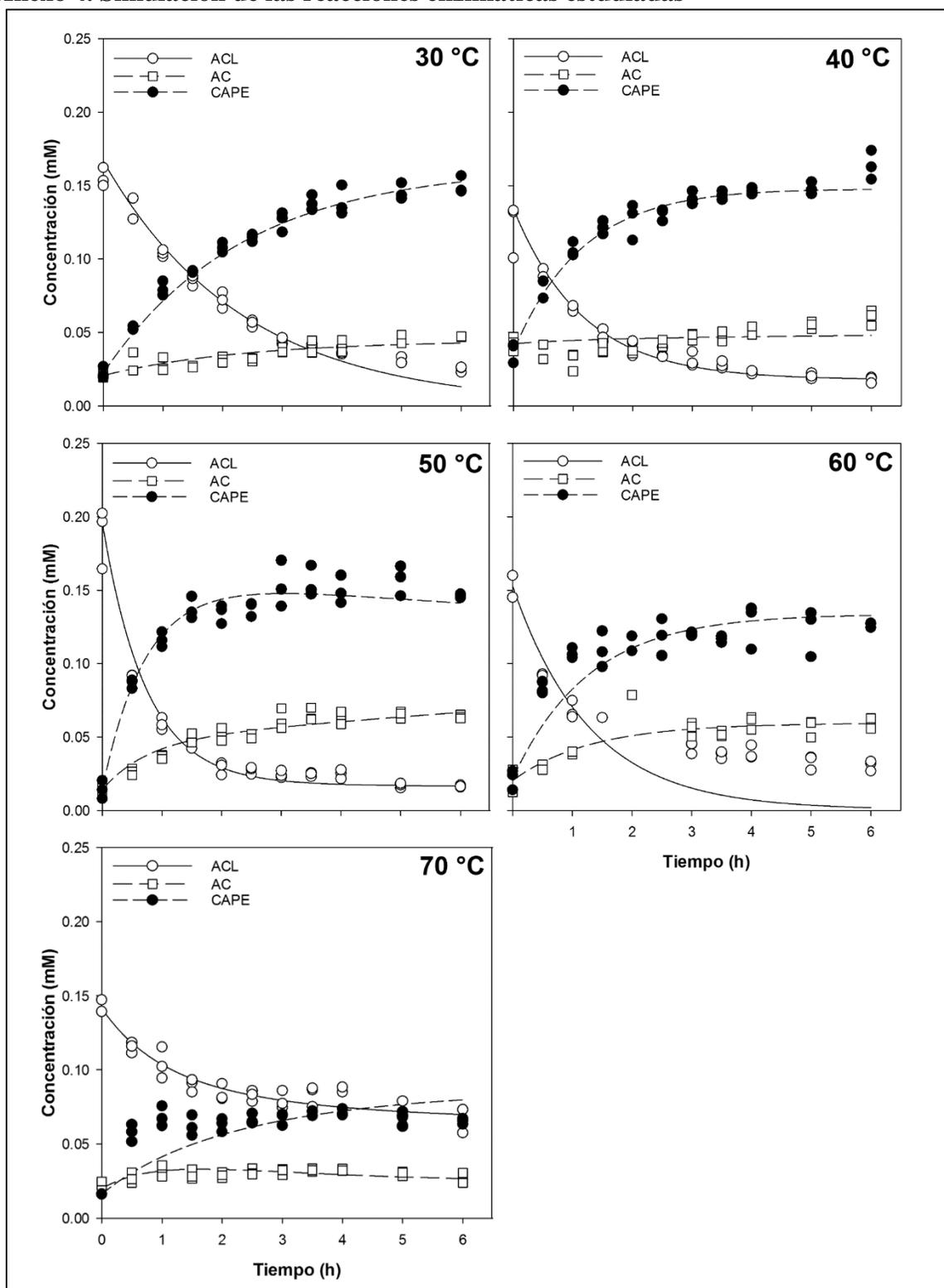


Figura A4.1 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la temperatura. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

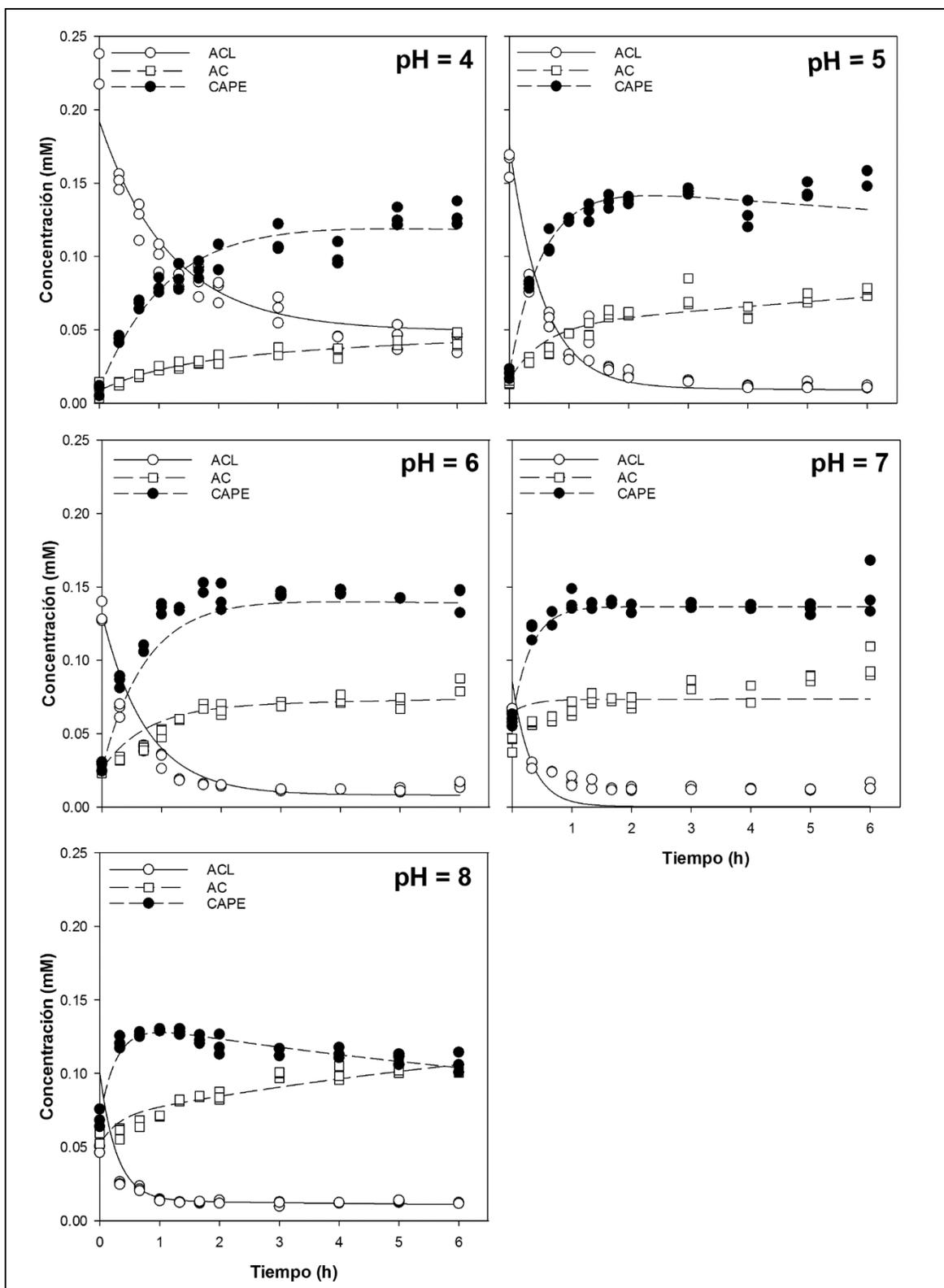


Figura A4.2 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto del pH. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

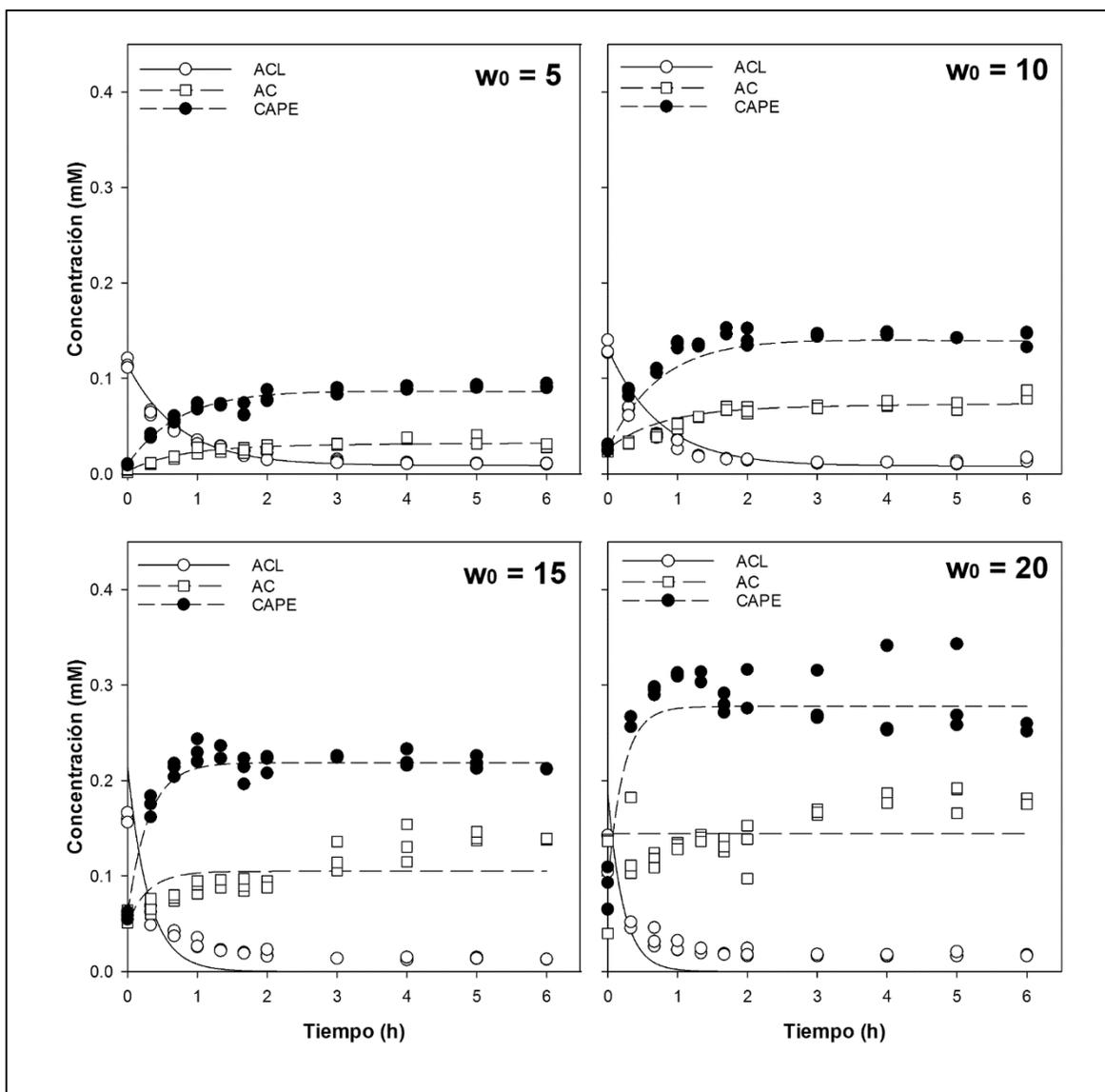


Figura A4.3 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de w_0 . Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

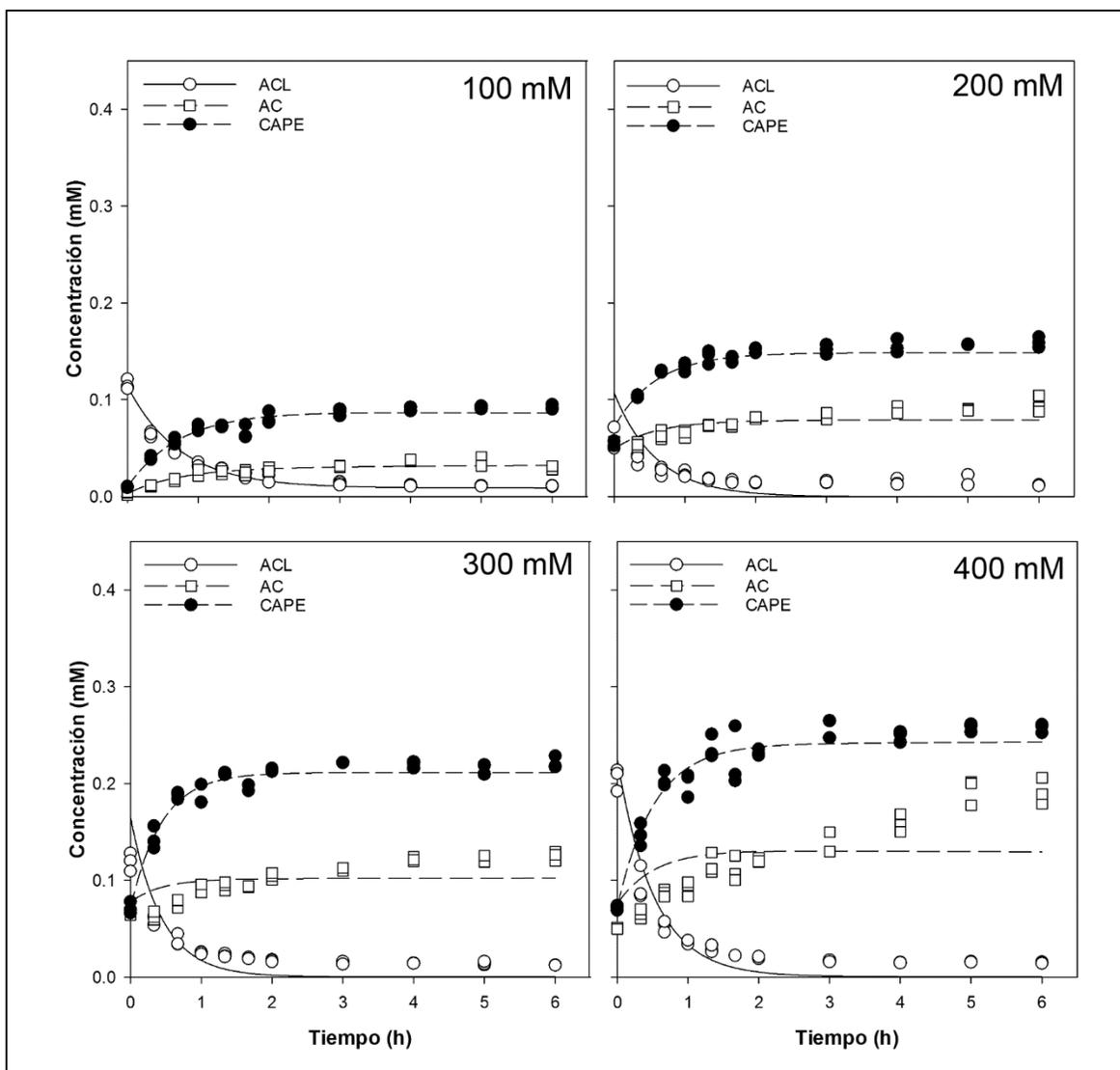


Figura A4.4 Síntesis de CAPE en microemulsiones: efecto de la concentración de AOT. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

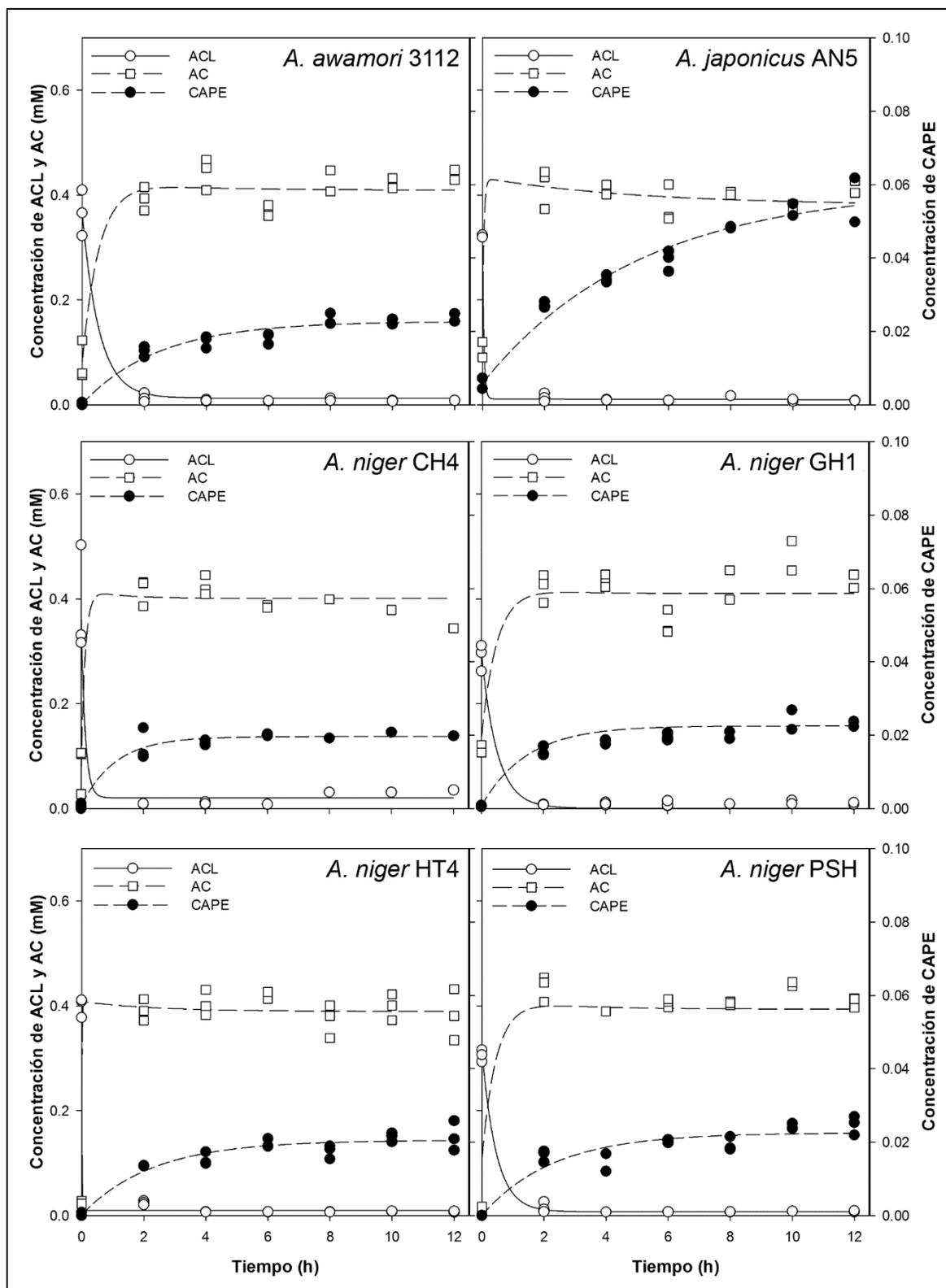


Figura A4.5a Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos producidos por FMS. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

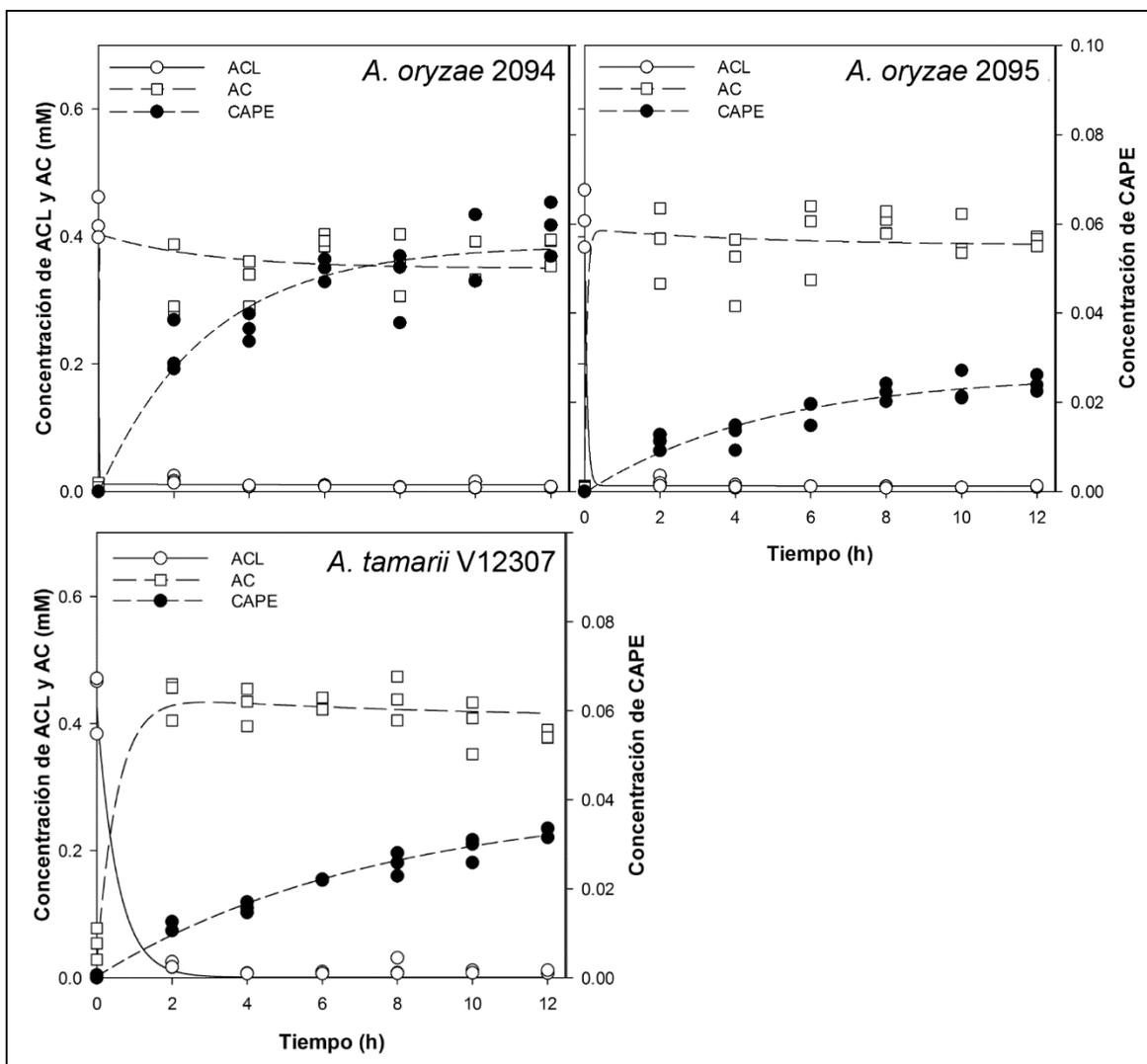
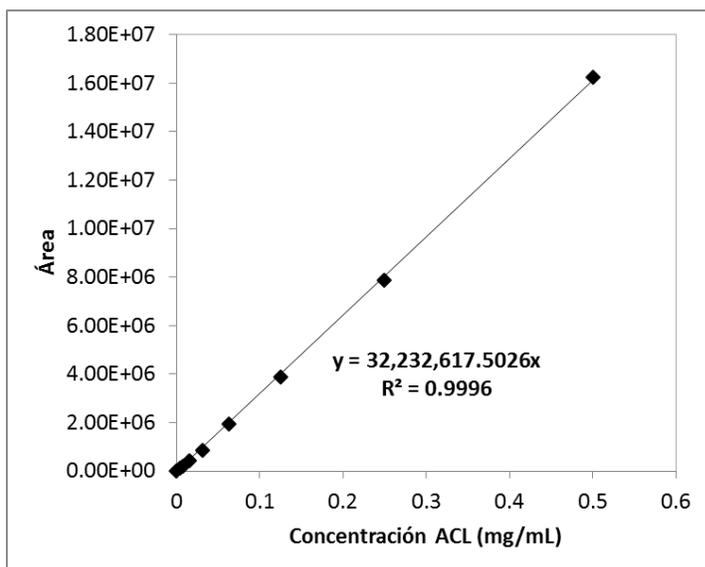
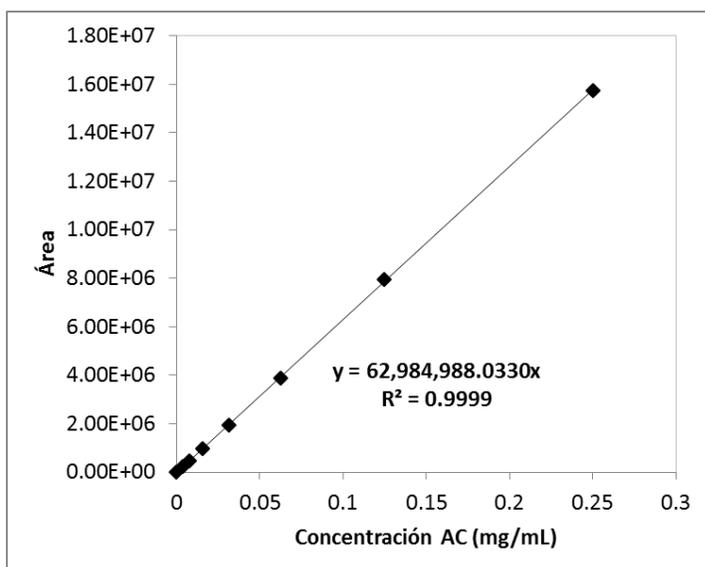


Figura A4.5b Síntesis de CAPE en microemulsiones catalizada por extractos enzimáticos producidos por FMS. Los marcadores representan los valores experimentales, las líneas representan los valores calculados con el modelo de pseudo primer orden.

Anexo 5. Curvas de calibración utilizadas para la cuantificación de AHCs**Figura A5.1** Curva de calibración de ACL**Figura A5.2** Curva de calibración de AC

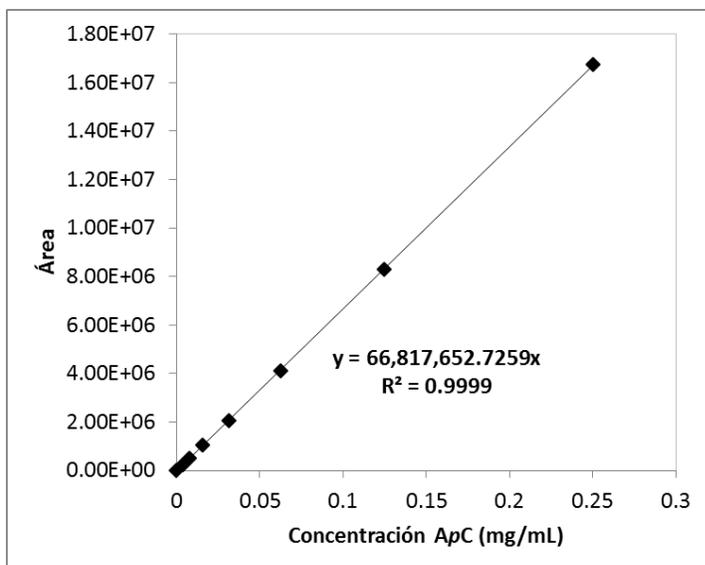


Figura A5.3 Curva de calibración de ApC

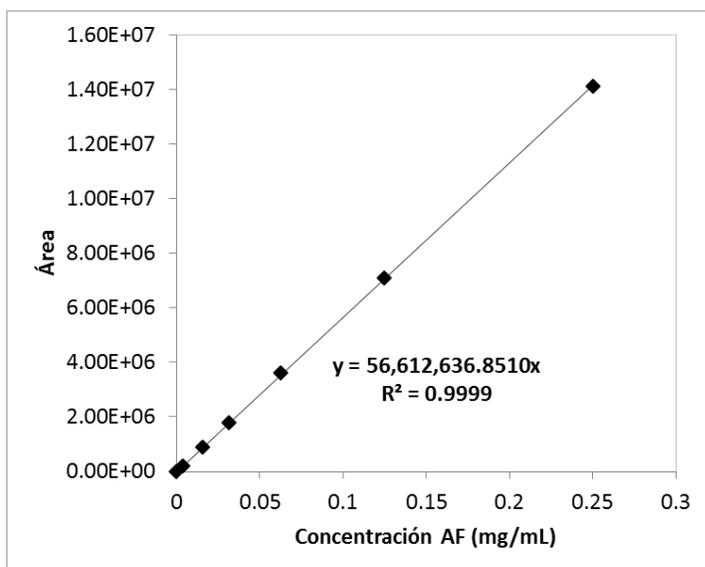


Figura A5.4 Curva de calibración de AF

Anexo 6. Publicaciones y presentaciones en congresos

Presentaciones en congresos:

Rodríguez-Durán, L.V., Ramírez-Coronel, M.A., Favela-Torres, E., Aguilar-González, C.N., Saucedo-Castañeda, G. (2012) Changes in hydroxycinnamic acids content of coffee pulp during ripening of coffee cherries. 5th International Congress Food Science and Food Biotechnology for Developing Countries. Nuevo Vallarta, Nayarit (Cartel).

Rodríguez-Durán, L.V., Ramírez-Coronel, M.A., Favela-Torres, E., Aguilar-González, C.N., Saucedo-Castañeda, G. (2013). Screening of *Coffea arabica* cultivars for the biotechnological extraction of hydroxycinnamic acids. XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Cancún, Quintana Roo (Cartel).

Rodríguez-Durán, L.V., Ortega-Hernández, A.K., Ramírez-Coronel, M.A., Favela-Torres, E., Aguilar-González, C.N., Saucedo-Castañeda, G. (2014). Microwave assisted extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. 6th International Congress Food Science, Biotechnology and Safety. Monterrey, Nuevo León (Cartel).

Rodríguez-Durán, L.V., Ramírez-Coronel, M.A., Favela-Torres, E., Aguilar-González, C.N., Saucedo-Castañeda, G. (2015). Selección de cepas fúngicas productoras de clorogenato hidrolasa. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guadalajara, Jalisco (Cartel).

Rodríguez-Durán, L.V., Ramírez-Coronel, A., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Saucedo-Castañeda, G. (2015). Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester catalyzed by crude extracts with chlorogenate hydrolase activity. VI International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology. Barcelona, España (Oral).

Capítulo de libro

Rodríguez-Durán, L.V., Torres-Mancera, M.T., Trujillo-Roldán, M.A., Valdez-Cruz, N.A., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G. (2016) Standard instruments for bioprocess analysis and control. En: *Current Developments in Biotechnology & Bioengineering Volume V: Industrial Biotechnology & Bioengineering* Larroche, C., Sanroman, M.A., Du, G., Pandey, A. (Eds). Aceptado.

Artículos

Rodríguez-Durán, L.V., Ramírez-Coronel, M.A., Aranda-Delgado, E., Nampoothiri, K.M., Favela-Torres, E., Aguilar, C.N., Saucedo-Castañeda, G. (2014) Soluble and bound hydroxycinnamates in coffee pulp (*Coffea arabica*) from seven cultivars at three ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (31): 7869–7876.

Gopalan, N., Rodríguez-Durán, L.V., Saucedo-Castañeda, G. K., Nampoothiri, M. (2015). Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass. *Bioresource Technology* 193(1): 534–544.

TOPIC: Functional Foods

Clave: FF-128

Changes in Hydroxycinnamic Acids Content Of Coffee Pulp During Ripening of Coffee Cherries

Rodríguez-Durán, L. V., Ramírez-Coronel, M. A., Favela-Torres, E., Aguilar-González, C. N., Saucedo-Castañeda, G.*

*Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I). Department of Biotechnology, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina 09340, D.F. Mexico. E-mail: saucedo@xanum.uam.mx

Coffee pulp is the main solid byproduct of wet processing of coffee cherries and it represents about 40-45% by weight of the fruit. Coffee pulp is currently under-utilized and in some cases discarded without treatment, therefore it could represent a serious environmental problem. On the other hand side coffee pulp content of phenolic compounds such as hydroxycinnamic acids are interesting. These compounds exhibit antioxidant, anti-carcinogenic and anti-inflammatory properties. Therefore, they have potential applications in the chemical, pharmaceutical and food industries. In this study we evaluated the hydroxycinnamic acid content in coffee pulp at three different states of maturity: immature, mature and intermediate. The coffee was obtained from the cooperative "Café, sorbo y aroma" located in San Cristobal de las Casas, Chiapas. The cherries are harvested and transported immediately to the laboratory where they were classified and pulped in a manual pulper. Coffee pulp was sun dried and ground to obtain a particle size of 0.15 to 0.84 mm. 2.5 g of coffee pulp were placed into Erlenmeyer flasks and subjected to an extraction process comprising three successive extractions with 25 mL of hexane at 30 °C and 150 rpm, followed by 3 extractions with aqueous methanol 80% at 55 °C and 150 rpm. The extracts obtained with hexane were discarded, whereas the methanol extracts were collected and analyzed. Hydroxycinnamic acid analysis was performed by HPLC following the method reported by Baqueiro et al (2010). Results showed that the analyzed coffee pulp contains high amounts of hydroxycinnamic acids with respect to previous studies performed by our research group (3.2-12.5 mg/g of coffee pulp). It was found that the most abundant hydroxycinnamic acid in coffee pulp is chlorogenic acid, and it represents about 90-96% of total hydroxycinnamic acids. The highest concentration of chlorogenic acid was found in the intermediate pulp (11.3 mg/g) followed by immature pulp (9.3 mg/g) whereas the mature fruit has a considerably lower amount of chlorogenic acid (3.1 mg/g). These findings indicate that unripe coffee cherries (now discarded during the "beneficio" as defective cherries) can be an inexpensive source of antioxidants such as chlorogenic acid.

(Keywords: coffee pulp, antioxidants, chlorogenic acid, hydroxycinnamic acids)



SCREENING OF COFFEA ARABICA CULTIVARS FOR THE BIOTECHNOLOGICAL EXTRACTION OF HYDROXYCINNAMIC ACIDS

Luis V. Rodríguez-Durán¹, Ma. Ascensión Ramírez-Coronel¹, Ernesto Favela-Torres¹, Cristóbal Aguilar-González², & Gerardo Saucedo-Castañeda^{2*}

1. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I). Department of Biotechnology, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina 09340, D.F. Mexico. E-mail: saucedo@xanum.uam.mx

2. Universidad Autónoma de Coahuila. Department of Food Science and Technology

Key words: Hydroxycinnamic acids, Chlorogenic acid, Coffee pulp.

Introduction. Coffee pulp (CP) is the main solid byproduct of wet processing of coffee cherries and it represents about 40-42% by weight of the fruit. CP is currently under-utilized and in some cases discarded without treatment, therefore it could represent a serious environmental problem (1). One of the most promising alternatives for the utilization of CP is the extraction of high-value compounds present in this material, such as hydroxycinnamic acids (HCAs). It was found that these phenolic acids are mainly esterified to the cell wall polysaccharides, and it was proposed an enzymatic treatment to extract these compounds (2). However, subsequent studies indicated that the amount and distribution of HCAs may differ radically from a CP cultivar to another (3).

Therefore, in this work we studied the content of free and esterified HCAs present in the pulp of coffee from 7 cultivar of *Coffea arabica*, to find out a proper raw material for the enzymatic extraction of HCAs.

Methods. Coffee cherries from 7 cultivars of mature (red) *C. arabica* were collected from a plantation in the municipality of Xico, Veracruz. Fruits were pulped in a manual pulper and air dried. Dry CP was milled and sieved at a particle size of 0.15-0.84 mm. A sample of 2 g of CP were placed into Erlenmeyer flasks and subjected to an extraction process comprising three successive extractions with 20 mL of hexane at 30°C, followed by 3 extractions with aqueous methanol 80 % at 55°C. The extracts obtained with hexane were discarded, whereas the methanol extracts were collected and analyzed for free HCAs. Solid residue was subjected to alkaline hydrolysis with 2M NaOH in the presence of ascorbic acid (1%) and EDTA (10 mM), for 2 h at 40°C. The hydrolyzate was filtered and analyzed for esterified HCAs. HCAs were analyzed by HPLC.

Results. Figure 1 shows that Red Garnica and Mundo Novo cultivars have the highest HCAs content, followed by Typica and Costa Rica. It was found that HCAs are present

mainly in the free form for all the cases analyzed. Table 1 indicates that CGA is the most abundant HCA, accounting for 72-82% of total HCAs. Although Garnica cultivar presents the highest content of HCAs, it represents a small fraction of total coffee cultivated. The variety Typica is the most cultivated in the state of Veracruz.

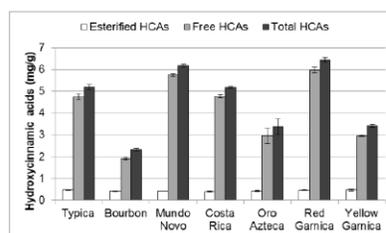


Fig.1 Free and esterified HCAs content of coffee pulp from 7 varieties of *C. arabica* (dry basis)

Table 1. Relative concentration of single HCAs in coffee pulp from 7 varieties of *C. arabica* (%)

Variety	CGA	CA	FA	pCA
Typica	78.2	19.1	2.6	0.1
Bourbon	79.6	15.4	4.7	0.3
Mundo Novo	81.8	15.3	2.7	0.1
Costa Rica	79.9	16.3	3.4	0.4
Oro Azteca	72.1	23.3	4.0	0.6
Red Garnica	79.8	17.2	2.7	0.3
Yellow Garnica	73.2	22.8	3.4	0.6

*CGA=Chlorogenic acid, CA=Caffeic acid, FA=Ferulic acid, pCA=p-Coumaric acid; C.V.=1-14%

Conclusions. In this work we found that CP from *C. arabica* var Typica could be a good source for the biotechnological production of HCAs such as CGA and CA.

References.

- Cleves R. (2004) In *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*. Wintgens J.N., Wiley-VCH Verlag GmbH, Germany pp. 716-730.
- Torres-Mancera M.T., Cordova-López J., Rodríguez-Serrano G., Roussos S., Ramírez-Coronel M.A., Favela-Torres E. & Saucedo-Castañeda G. (2011). *Food Technology and Biotechnology* 49(3): 369-373.
- Rodríguez-Durán, L. V., Ramírez-Coronel, M. A., Favela-Torres, E., Aguilar-González, C. N. & Saucedo-Castañeda, G. (2012). In 5th International Congress Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries, Book of abstracts. Nuevo Vallarta, México.

Area: Functional Foods

Microwave Assisted Extraction of Hydroxycinnamic Acids from Coffee Pulp

Rodríguez-Durán, L. V.¹; Ortega-Hernández, A. K.¹; Ramírez-Coronel, M. A.¹; Favela-Torres, E.¹; Aguilar-González, C. N.² & Saucedo-Castañeda, G.^{1*}

1. Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I). Department of Biotechnology, Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina 09340, D.F. Mexico. *E-mail: saucedo@xanum.uam.mx

2. Universidad Autónoma de Coahuila. Department of Food Science and Technology, School of Chemistry, V. Carranza & González Lobo s/n República Oriente 25280 Saltillo, Coahuila, Mexico

Coffee pulp (CP) is the main solid byproduct of wet processing of coffee cherries and it represents about 40-45% by weight of the fruit. CP is currently under-utilized and in some cases discarded without treatment, therefore it could represent a serious environmental problem. On the other hand, the phenolic compounds present in CP, such as hydroxycinnamic acids (HCAs) are interesting. These compounds exhibit antioxidant, anti-carcinogenic and anti-inflammatory properties. Therefore, they have potential applications in the chemical, pharmaceutical and food industries. In this study, we evaluated the use of microwave assisted extraction for the recovery of HCAs from CP. Extractions were carried out in a microwave oven MARS Express (CEM, USA). 1 g (dry basis) of CP was in each PTFE tube. Then, 10 mL of solvent were added and the mixture was agitated. Tubes were subjected to microwave treatment at 60 °C from 1 to 16 min, using a variable power (0 to 400 W). Obtained extracts were filtered through a regenerated cellulose membrane (0.2 µm), and analyzed by HPLC. The effect of the solvent (50 % v/v, aqueous ethanol or methanol) on the extraction of HCAs from CP was evaluated. Then, five concentrations (0, 25, 50, 75 and 100%, v/v) of the selected solvent were evaluated. The highest amount of HCAs was recovered using 50% (v/v) aqueous ethanol as solvent. Variations in ethanol concentration significantly reduced the amount from extracted HCAs. The highest amount of HCAs was extracted at 2 min and then the amount of HCAs remained constant. Under the best conditions, we recovered 100% free HCAs from CP (4.19 ± 0.2 mg/g), as determined by successive extractions with hexane and methanol. Microwave assisted extraction was carried out in a single step, in a short time (2-4 min) and using "environmentally friendly" solvents. Therefore this methodology could be used for the analytical extraction of HCAs from CP.

(Key words: hydroxycinnamic acids, coffee pulp, microwave assisted extraction)


SELECCIÓN DE CEPAS FUNGICAS PRODUCTORAS DE CLOROGENATO HIDROLASA

 Luis V. Rodríguez-Durán¹, Ma. Ascensión Ramírez-Coronel¹, Ernesto Favela-Torres¹, Cristóbal Aguilar-González², & Gerardo Saucedo-Castañeda¹
¹. Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología. C.P. 09340 México, D.F.

². Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de Investigación en Alimentos. C.P. 25280 Saltillo, Coahuila.

rodriguez.lvd@gmail.com
Palabras clave: Clorogenato hidrolasa, ácido clorogénico, fermentación en medio sólido.

Introducción. La clorogenato hidrolasa (CHasa) es una enzima (E.C. 3.1.1.42) que cataliza la hidrólisis de ácido clorogénico (ACI) produciendo cantidades equimolares de ácido quínico (AQ) y ácido cafeico (AC). Esta enzima se ha utilizado principalmente para la producción de AC a partir de subproductos agroindustriales ricos en ACI, como la pulpa de café y el bagazo de manzana (1, 2). La CHasa también puede ser utilizada para la modificación de compuestos fenólicos mediante reacciones de esterificación (3). Estos compuestos tienen importantes actividades biológicas con potencial aplicación comercial. Sin embargo, la falta de CHasas comerciales dificulta el desarrollo de estas aplicaciones. El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas fúngicas capaces de producir CHasa en Fermentación en Medio Sólido (FMS).

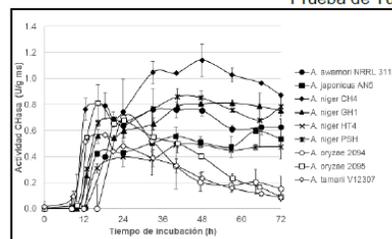
Metodología. Se evaluaron 10 cepas fúngicas (9 del género *Aspergillus* y 1 del género *Rhizomucor*) para la producción de CHasa. Estas cepas se inocularon sobre placas de agar con ACI como única fuente de carbono. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 5 días. Se midió el crecimiento radial cada 24 h. A los 3 días de incubación se revelaron cajas con NH₄OH al 28% y se midió el halo de hidrólisis y el índice de potencia (IP=diámetro del halo/diámetro de la colonia). Las cepas que presentaron halos de hidrólisis se utilizaron para la producción de CHasa por FMS. La FMS se llevó a cabo en viales de 4 mL usando 0.3 g de agrolita como soporte inerte y 0.5 mL de un medio líquido con 15 g/L de extracto de café verde como inductor (1). Los viales se incubaron durante 5 días a 30 °C. El contenido de ACI, AC y actividad CHasa en los extractos extracelulares se determinó por HPLC. Las cepas seleccionadas se utilizaron para la producción de CHasa en reactores de lecho empacado con aireación forzada. En estos reactores se determinó además de las variables antes mencionadas, la composición del gas de salida.

Resultados. Todas las cepas evaluadas fueron capaces de crecer en el medio de cultivo utilizado, con tasas de crecimiento de 0.216 a 0.277 mm/h. Sólo las cepas del género *Aspergillus* produjeron halos de hidrólisis (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre los índices de potencia, por lo que las 9 cepas de *Aspergillus* se utilizaron para la producción de CHasa por FMS. Para todas las cepas se observó una acumulación de AC entre las 8 y las 16 h y un consumo total del ACI y AC antes de las 24 h de incubación (datos no mostrados).

Tabla 1. Tasa de crecimiento radial e índice de potencia de 10 cepas fúngicas usando ACI como única fuente de carbono.

Cepa	Tasa de crec. radial (mm/h)	Índice de potencia
<i>A. awamori</i> NRRL 3112	0.243 ± 0.005 ^{cd}	1.26 ± 0.02
<i>A. japonicus</i> AN5	0.242 ± 0.019 ^{cd}	1.36 ± 0.05
<i>A. niger</i> CH4	0.255 ± 0.008 ^{bcd}	1.29 ± 0.03
<i>A. niger</i> GH1	0.276 ± 0.002 ^{ab}	1.31 ± 0.11
<i>A. niger</i> HT4	0.267 ± 0.003 ^{ab}	1.28 ± 0.08
<i>A. niger</i> PSH	0.277 ± 0.002 ^a	1.23 ± 0.00
<i>A. oryzae</i> 2094	0.246 ± 0.006 ^{cd}	1.23 ± 0.00
<i>A. niger</i> 2095	0.216 ± 0.008 ^e	1.27 ± 0.00
<i>A. tamarii</i> V12307	0.240 ± 0.008 ^d	1.20 ± 0.00
<i>R. pusillus</i> 23aIV	0.264 ± 0.005 ^{abc}	N.D.

Prueba de Tukey, α=0.05


Fig. 1. Actividad CHasa durante la FMS en viales.

Se observaron dos patrones de producción de CHasa (figura 1). Las cepas de *A. tamarii* y *A. oryzae* alcanzaron la máxima actividad CHasa dentro de las primeras 24 h, pero la actividad decayó rápidamente. Las cepas de *A. awamori*, *A. japonicus* y *A. niger* alcanzaron la máxima actividad CHasa después de las 24 h la cual permanece estable hasta el final del cultivo (72 h). Este segundo grupo se utilizó para la producción de CHasa en reactores de lecho empacado con aireación forzada. En estas condiciones, la cepa de *A. awamori* produjo la mayor actividad CHasa (0.741 U/g ms a las 25 h), pero la cepa CH4 de *A. niger* presentó la mayor productividad (0.047 U/g ms·h a las 14 h de incubación).

Conclusiones. Se pre-seleccionaron 6 cepas fúngicas, de las cuales la cepa NRRL 3112 de *A. awamori* y la cepa CH4 de *A. niger* fueron las más convenientes para la producción de CHasa por FMS a nivel laboratorio.

Bibliografía

- Asther M, Estrada Alvarado M I, Haon M, Navarro D, Asther M, Lesage-Meessen L, Record E (2005) *J Biotechnol*. 115 (1) 47-56.
- Ramírez L, Arrizon J, Sandoval G, Cardador A, Bello-Mendoza R, Lappe P, Mateos-Díaz J C (2008) *Appl Biochem Biotechnol* 151 (2-3) 711-723.
- Kishimoto N, Kakino Y, Iwai K, Fujita T (2005) *Appl Microbiol Biotechnol* 68 (1) 198-202.

Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester catalyzed by crude extracts with chlorogenate hydrolase activity

L. V. Rodríguez-Durán¹, A. Ramírez-Coronel¹, E. Favela-Torres¹, C. N. Aguilar² and G. Saucedo-Castañeda²

¹Department of Biotechnology, Autonomous Metropolitan University, San Rafael Atlixco 186, 09340, Mexico City, Mexico

²Department of Food Science and Technology, School of Chemistry, Autonomous University of Coahuila, Blvd. V. Carranza and González Lobo s/n, 25280 Saltillo, Mexico

Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is one of the main active compounds of propolis. CAPE has antioxidant, antiinflammatory, antiviral, immunomodulatory, antiangiogenic, anti-invasive, anti-metastatic, carcinostatic, neuroprotective, hepatoprotective and cardioprotective activities [1].

CAPE is currently extracted from natural sources, such as propolis. However natural sources are limited and costly. Moreover the recovery and purification of CAPE from natural sources is complicated and time consuming [2]. Therefore, several chemical and enzymatic methods for the synthesis of CAPE have been proposed [3]. Chemical methods have long preparation times (up to 96 h) with relatively low yields (38-70%) [4]. Enzymatic methods have high yields (90-100%), but require long reaction times (48-60 h). They also require large amounts of biocatalyst [3]. This is due to the low solubility of the substrates and the low affinity between biocatalyst and the substrates. Therefore, in this work we studied the enzymatic synthesis CAPE catalyzed by crude extracts with chlorogenate hydrolase activity produced by filamentous fungi in solid state fermentation.

We developed a new technique in agar plates for screening chlorogenate hydrolase producing microorganisms based on the oxidation of residual chlorogenic acid with a concentrated ammonium hydroxide aqueous solution. Using this technique we found nine *Aspergillus* spp strains capable of growing with chlorogenic acid as sole carbon source and forming hydrolysis halos.

Selected fungal strains were used for production of chlorogenate hydrolase in packed bed solid state fermentation bioreactors. Solid state fermentation was carried out using perlite as an inert support and green coffee extract as a carbon source. Growth was measured indirectly by respirometric analysis, substrate consumption and chlorogenate hydrolase activity were determined by HPLC.

Crude extracts produced at 24 h were concentrated by ultrafiltration, and adjusted to an activity of 1.7 U/mL. Concentrated extracts were used for the synthesis of CAPE by transesterification of chlorogenic acid and 2-phenyl ethanol in a water in oil microemulsion system (Water/AOT/ Isooctane). Under the studied conditions, the crude extract produced by *Aspergillus japonicus* AN5 showed the best results (100% conversion and 19% yield at 24 h). Using a more concentrated extract (13.1 U/mL) improved the rate and yield of the reaction (100% conversion and 47% yield at 12 h).

This is the first report on the synthesis of CAPE by transesterification of chlorogenic acid in a microemulsion system. The results are promising, however, additional work is needed to optimize reaction conditions and to identify and characterize the enzymes involved in this reaction.

Keywords: Caffeic acid phenethyl ester; Chlorogenate hydrolase

References

- [1] Tolba, M.F., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Rahman, S.Z., and Abdel-Naim, A.B. (2013). Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life* 65, pp. 699-709.
- [2] Ye, S., Zhu, R., Yang, Q., and Zhou, Y. (2012). Method for preparing caffeic acid phenethyl ester. Chinese Patent Office.
- [3] Zhang, P., Tang, Y., Li, N.-G., Zhu, Y., and Duan, J.-A. (2014). Bioactivity and chemical synthesis of caffeic acid phenethyl ester and its derivatives. *Molecules* 19, pp. 16458.
- [4] Son, S., Lobkowsky, E.B., and Lewis, B.A. (2001). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): synthesis and x-ray crystallographic analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49, pp. 236-238.

20. Standard instruments for bioprocess analysis and control

Rodríguez-Duran L.V.¹, Torres-Mancera M.T.², Trujillo-Roldán M.A.³, Valdez-Cruz N.A.³,
Favela-Torres E.¹ & Saucedo-Castañeda G.^{1*}

1. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, México D.F., México
2. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Tecnológico de Estudios Superiores de Coacalco, Av. 16 de Septiembre 54, Col. Cabecera Municipal, CP 55700, México, México.
3. Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. AP. 70228, México, D.F., CP. 04510, México.

*email: saucedo@xanum.uam.mx

Soluble and Bound Hydroxycinnamates in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) from Seven Cultivars at Three Ripening Stages

Luis V. Rodríguez-Durán,[†] Ma. Ascención Ramírez-Coronel,[†] Eduardo Aranda-Delgado,[§]
 K. Madhavan Nampoothiri,[#] Ernesto Favela-Torres,[†] Cristóbal N. Aguilar,[‡]
 and Gerardo Saucedo-Castañeda^{*,†}

[†]Department of Biotechnology, Autonomous Metropolitan University, Campus Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, 09340 Iztapalapa, D.F. Mexico City, Mexico

[§]Terranova Lombricultores, Loma escondida 5, 91517 Coatepec, Veracruz, México

[#]Biotechnology Division, National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), CSIR, 695019 Trivandrum, Kerala, India

[‡]Department of Food Science and Technology, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza and González Lobo s/n, 25280 Saltillo, Coahuila, Mexico

Supporting Information

ABSTRACT: The contents of soluble and bound hydroxycinnamates (HCAs) were analyzed in coffee pulp (CP) of seven cultivars of *Coffea arabica* at three different ripening stages. Methodologies for the extraction and analysis of HCAs were evaluated and improved. HCAs were present mainly in the soluble fraction (68–97%). Chlorogenic acid was the main phenolic acid (94–98%) in the soluble fraction, whereas caffeic acid was the most abundant HCA found in the bound fraction (72–88%). Small amounts of free and bound ferulic and *p*-coumaric acids were also detected. The content of total HCAs in CP reached the maximum concentration at the semiripe stage (7.4–25.5 mg/g CP, dw) but decreased at the ripe stage for six of the seven cultivars. These findings suggest that unripe or semiripe coffee cherries, considered as defective cherries, are a potential inexpensive source of phenolic compounds, such as chlorogenic and caffeic acids.

KEYWORDS: coffee pulp, ripening, hydroxycinnamates, chlorogenic acid, caffeic acid

INTRODUCTION

Coffee pulp (CP) is the main solid byproduct derived from wet processing of coffee fruits. It represents around 40% of the weight of fresh cherries.¹ CP consists of the outer skin or pericarp and most of the mesocarp, which is mechanically removed by pressing the coffee fruit in a pulper.²

Traditional applications of CP include its use as fertilizer, livestock feed, compost, etc. These applications utilize only a fraction of the available quantity as they are not technically very efficient. Thus, there is still a need to find other alternative uses for this solid byproduct.³ One of the most promising applications for the use of CP involves the extraction and recovery of bioactive compounds such as phenolic acids present in this material. Through this process, powerful natural antioxidants with diverse industrial applications can be obtained. Furthermore, the new solid residue obtained (CP without phenolics) could be used in some other applications, such as biofertilizer or animal feed, or as a substrate for the production of edible mushrooms.

Four major classes of polyphenols have been identified in CP: flavan-3-ols, flavonols, anthocyanidins, and hydroxycinnamates (HCAs). Among them, HCAs represents from 39 to 49% of total phenolic compounds in CP.⁴ HCAs have gained scientific interest due to their antioxidant activity, which may have some health beneficial effects *in vivo*.⁵

We have previously reported the content of free and bound HCAs in CP.⁶ We found that most of the HCAs were

covalently bound to the cell wall (about 74–97% depending on the compound), and they could not be removed by solvent extraction. Thus, we proposed an enzymatic method for the extraction of HCAs from CP.^{6,7}

However, the amount and distribution of HCAs may differ radically from a CP sample to another. This variability could be due to the characteristics of the coffee samples (cultivar, place of origin, culture conditions, maturity, etc.), the postharvest management (methods of pulping, drying, storage, etc.), or even the analytical methods used.

Available data on the content and distribution of HCAs in CP are scarce. Studies comparing the content of phenolic compounds in the pulp of different coffee cultivars are limited to the analysis of soluble compounds.^{8,9} Furthermore, these studies consider only the stage of commercial maturity. On the other hand, studies related to the content of free and bound HCAs in CP consider only one cultivar and one stage of ripeness.^{6,10}

In this paper, we present the improvement of a method for the extraction and quantitation of soluble and bound HCAs and its application to the analysis of coffee pulp from seven cultivars of *Coffea arabica* at three different stages of ripeness.

Received: April 7, 2014

Revised: July 7, 2014

Accepted: July 10, 2014

Published: July 10, 2014

Table 1. Chromaticity of Coffee Fruits Surface for Seven Cultivars of *Coffea arabica* at Three Stages of Ripening^a

cultivar	ripening stage	chromaticity (r)	chromaticity (g)	chromaticity (b)	r/g ratio
Typica	unripe	0.38 ± 0.03i	0.46 ± 0.01bc	0.16 ± 0.03bcd	0.83
	semiripe	0.59 ± 0.05def	0.31 ± 0.05f	0.10 ± 0.02efg	1.93
	ripe	0.69 ± 0.06ab	0.17 ± 0.02h	0.14 ± 0.04cde	4.05
Bourbon	unripe	0.35 ± 0.01i	0.51 ± 0.02a	0.14 ± 0.02cde	0.67
	semiripe	0.54 ± 0.06fgh	0.35 ± 0.06def	0.11 ± 0.01efg	1.57
	ripe	0.65 ± 0.08bc	0.19 ± 0.03h	0.16 ± 0.05bcd	3.52
Mundo Novo	unripe	0.33 ± 0.02i	0.50 ± 0.01ab	0.17 ± 0.03abc	0.68
	semiripe	0.50 ± 0.03gh	0.37 ± 0.03d	0.13 ± 0.02de	1.35
	ripe	0.61 ± 0.05cde	0.20 ± 0.02gh	0.19 ± 0.03ab	3.04
Costa Rica	unripe	0.38 ± 0.01i	0.48 ± 0.02ab	0.13 ± 0.02cde	0.79
	semiripe	0.55 ± 0.03fgh	0.34 ± 0.04def	0.12 ± 0.02ef	1.62
	ripe	0.61 ± 0.04cd	0.20 ± 0.01gh	0.19 ± 0.03ab	3.13
Oro Azteca	unripe	0.36 ± 0.02i	0.47 ± 0.01bc	0.17 ± 0.02abcd	0.78
	semiripe	0.53 ± 0.04fgh	0.37 ± 0.04d	0.10 ± 0.02efg	1.44
	ripe	0.74 ± 0.04cd	0.19 ± 0.02gh	0.08 ± 0.02fg	3.94
Red Garnica	unripe	0.38 ± 0.01i	0.43 ± 0.01c	0.19 ± 0.02ab	0.89
	semiripe	0.49 ± 0.02h	0.32 ± 0.02ef	0.19 ± 0.01ab	1.52
	ripe	0.55 ± 0.02efg	0.24 ± 0.01g	0.21 ± 0.02a	2.30
Yellow Garnica	unripe	0.38 ± 0.02i	0.50 ± 0.01ab	0.12 ± 0.02ef	0.77
	semiripe	0.49 ± 0.02h	0.44 ± 0.01c	0.07 ± 0.02g	1.12
	ripe	0.57 ± 0.03def	0.36 ± 0.03de	0.07 ± 0.02g	1.60

^aData are presented as a mean value ± standard deviation; the same letter in a column means no significant differences (Tukey HDS test, $\alpha = 0.05$) between samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Chlorogenic, caffeic, *p*-coumaric, ferulic, and ascorbic acids were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); hexane, methanol, acetic acid, sodium hydroxide, and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were purchased from J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Plant Material. Coffee cherries from seven cultivars (Typica, Bourbon, Mundo Novo, Costa Rica, Oro Azteca, Red Garnica, and Yellow Garnica) were collected in December 2012 from a plantation in the municipality of Xico, Veracruz, Mexico (latitude 96°57' N; longitude 19°25' W; altitude ≈1135 m above sea level). Coffee fruits were harvested at three different stages of ripening (unripe, semiripe, and ripe). Identification of coffee cultivars and classification by ripening stage was performed by trained local personnel according to the physical characteristics of plants and fruits.

Samples were transported immediately under refrigeration to the laboratory and stored at 4 °C until processing (within 48 h). Fruits were manually pulped, and the obtained CP was dried in a tray dryer with forced aeration for 72 h at 25–40 °C. Dry CP was milled with a blade grinder and sieved to obtain a particle size of 0.15–0.84 mm (20–100 mesh).

CP from a commercial wet process (beneficio) located in the same region (Xico, Veracruz, Mexico) was used to standardize the methodology for HCA extraction. This CP was sun-dried for 72 h until reaching moisture content of <10%.

Physical Characterization of Coffee Fruits. Average weight, volume, and color of fruits were measured. Average weight was calculated from 100 fruits by triplicate. Average volume was measured by water displacement of 100 fruits in a 1 L graduated cylinder.

The external color of coffee fruits was evaluated by image analysis techniques. Pictures of at least 10 fruits per sample were obtained with a digital camera under standardized conditions of lighting and distance. Thereafter, the pictures were analyzed using the software Fiji (available

at <http://fiji.sc/Fiji>). Average values *R*, *G*, and *B* were obtained and used to calculate the chromaticity parameters *r*, *g*, and *b*, using the following equations:

$$r = \frac{R}{R + G + B}; g = \frac{G}{R + G + B}; b = \frac{B}{R + G + B}$$

R, *G*, and *B* represent the red, green, and blue color intensity, respectively, and *r*, *g*, and *b* are the normalized trichromatic coefficients (intensity independents).¹¹

Extraction of Soluble and Bound HCAs. Extraction of soluble HCAs was performed by successive extractions with hexane and methanol as previously reported.^{4,10} First, 2 g (DW) of CP was put into a 125 mL Erlenmeyer flask. Then, sample was extracted three times with 20 mL of hexane for 30 min at 30 °C and 150 rpm. Hexane extracts were discarded, and the remaining solids were extracted three times with 20 mL of aqueous methanol (20:80, v/v) acidified with 1% (v/v) acetic acid. Methanolic extraction was carried out for 35 min at 55 °C with agitation at 100 rpm. Methanolic extracts were centrifuged (8000 rpm, 10 min), filtered through 0.22 μm regenerated cellulose membranes, and analyzed by HPLC.

To confirm the efficiency of the extraction of soluble HCAs, a sample of CP (from a commercial wet process) was submitted to successive methanolic extractions, and each extract was analyzed separately. The effect of hexane extraction was also investigated.

Bound HCAs were extracted by alkaline hydrolysis using a method described previously,^{5,10} which was modified as follows: The solids obtained from hexane and aqueous methanol extractions were immediately hydrolyzed with 20 mL of NaOH at different concentrations (0.5, 1.0, and 2.0 M), with EDTA (10 mM) and ascorbic acid (1% w/v). Mixtures were incubated for 15, 30, 60, 120, and 240 min at 40 °C under constant agitation on an orbital shaker (150 rpm). Subsequently, the pH of the mixtures was adjusted to 3.0 ± 0.1 with 6 M HCl. Then, mixtures were filtered through a no. 2

fritted glass filter, the solid residues were extracted with 10 mL of distilled water, and the filtrates were combined and filtered through a 0.22 μm regenerated cellulose membrane and analyzed by HPLC. All extractions were under darkness by triplicate. The extracts obtained were kept at $-18\text{ }^\circ\text{C}$ and protected from light until analysis. At this stage, chlorogenic acid (compound 1) was used as internal standard.

HPLC Analysis. Analysis of HCAs was carried out in a Shimadzu Prominence HPLC system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) consisting of an LC-20AT pump, a DGU-20AS degasser, an SIL-20A HT autosampler, an SPD-M20A diode array detector, and a CTO-20A oven. Separation was performed using a Varian Polaris Amide C18 column ($200 \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$). An isocratic method was used with a mobile phase consisting of 35% (v/v) methanol, 1.25% (v/v) acetic acid, and 63.75% (v/v) water at a flow rate of 1 mL/min for 20 min. HCAs were detected at 320 nm. Quantitation was performed by the external standard method. Calibration curves were obtained for each compound in concentrations ranging from 0.025 to 0.5 mg/mL. Results were expressed as milligrams per gram of CP (dw).

Statistical Analysis. All extractions and analyses were carried out at least in triplicate, and the results are expressed as means \pm standard deviation. Tukey's HSD test was used to compare the means and to reveal significant differences between samples ($\alpha = 0.05$). Statistical analysis was performed using the statistical package JMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Physical Characterization of Coffee Fruits. Coffee cherries were classified by trained personnel at the plantation. Then, a physical characterization of fruit samples was carried out in the laboratory. Morphological differences between fruits of the same cultivar but at different ripening stage as well as differences between fruits at the same ripening stage but different cultivar (for some cultivars) were observed. These observations were confirmed by the physical characterization (Supporting Information Figures 1–3).

As expected, we observed a progressive increment of fruit size and weight for all cultivars as a function of ripening. We also observed significant differences between coffee fruits at the same ripening stage but from different cultivars. The larger and heavier fruits were the ripe coffee cherries of Oro Azteca cultivar, followed by the cherries of Mundo Novo and Costa Rica cultivars. The smaller and lighter ripe fruits belonged to the Bourbon cultivar.

Changes in the size and weight of coffee cherries during the ripening process have been previously described by several authors.^{12–14} Physical differences (weight and volume) between coffee cherries from different cultivars are known by coffee growers and processors, but they are poorly described in the scientific literature.

Changes in color have been traditionally considered as the main criterion determining the ripening stage of coffee cherries. This characteristic is used to decide the beginning of the harvest.¹⁵ We used image analysis techniques to measure the external color of coffee cherries and to establish differences between ripening stages of coffee fruits.

We observed a progressive increase in the red (r) component of the color as well as a decrease in the green (g) component for all coffee cultivars (Table 1). On the other hand, the blue component was the lowest for all coffee samples. Moreover, we did not observe the same trend in the change of the parameter b (blue) during ripening of the fruits of different cultivars. Therefore, we consider that the r (red) and g (green) chromaticity parameters should be used to evaluate color changes during ripening of coffee cherries.

Values of r increased from 0.335–0.387 for unripe fruits to 0.552–0.736 for ripe cherries. Values of g decreased from 0.427–0.514 for unripe fruits to 0.170–0.357 for ripe cherries. Another parameter that could be considered for assessing color change during ripening of coffee cherries is the ratio between r and g chromaticity parameters (r/g ratio). Values of r/g lower than 1 were obtained for unripe fruits. For semiripe fruits, r/g ratio values ranged between 1 and 2 (1.12–1.93), and for ripe fruits, values of r/g were >2 (2.30–4.06) except for the yellow cultivar ($r/g = 1.60$).

Several authors have studied the changes in the external color of coffee fruits using spectrophotometric^{16–18} or computer vision techniques.¹⁹ These methodologies allow obtaining reliable and reproducible measurements of fruit color. However, they require specialized equipment, which is not always available. Other authors have evaluated the color of coffee cherries by a subjective comparison with color reference charts.^{15,20} Color charts are useful aids to compare colors, but they have some disadvantages. In this method color assessment depends on the visual abilities of judges. On the other hand, it is difficult to compare a uniformly colored card with the color of a nonhomogenous surface.²¹ In all cases an increase in the red chromaticity and a decrease in green chromaticity have been observed.

Changes in external color can be explained by chemical changes in the exocarp (peel) during ripening. Exocarp persists as a green-colored tissue during most of the coffee fruit development. However, in the ripe state, it becomes red (or yellow, for some cultivars) as result of the decrease of chlorophyll and accumulation of anthocyanins.²²

Extraction of Soluble and Bound HCAs. The phenolic compounds of CP have been the subject of several studies.^{4,6,8–10} The interest in these compounds is due to their biological activities (antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, etc.).⁶ Most of these studies are limited to the compounds extractable with aqueous methanol solutions.^{4,8,9} However, significant amounts of phenolic compounds may remain in the solid residues after such extractions. For example, phenolic acids covalently bound to cell wall polysaccharides.²³

In preliminary studies, it was found that the estimation of soluble and bound phenolic compounds in CP is strongly dependent on the methodologies used for their extraction and analysis. Thus, we decided to evaluate the conditions commonly used for the extraction of phenolic acids.

As a first step, we evaluated the effects of a hexane extraction followed by an aqueous methanolic (20:80, v/v) extraction on the recovery yield of soluble HCAs (Figure 1). It was calculated using compound 1, because it was the main soluble HCA (93.8–98.8%). Figure 2 shows the amount of compound 1 extracted by four successive methanolic extractions with and without pretreatment with hexane. Because no compound 1 was detected from the fifth methanolic extraction, the amount of compound 1 obtained in the first four extractions was considered as the total soluble compound 1, and this amount was used to calculate the extraction yield.

No significant differences were found between the yields of 1 obtained with or without treatment with hexane. Thus, hexane extraction does not affect HCA extraction, but it may help to remove less polar compounds such as carotenoids and other lipophilic compounds that can interfere with the chromatographic analysis of extracts.⁴ Therefore, we decided to make three hexane extractions followed by three successive

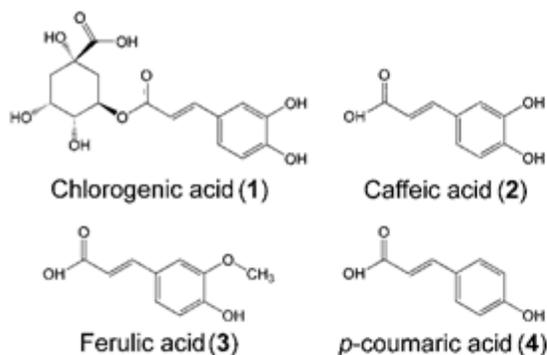


Figure 1. Structures of hydroxycinnamates analyzed in coffee pulp samples.

methanolic extractions for analytical purposes. In these conditions, >98% of 1 was recovered.

Several authors performed alkaline hydrolysis for the extraction of covalently bound phenolic acids. However, it is known that this alkaline hydrolysis led to important losses of phenolic compounds, particularly dihydroxy derivatives such as caffeic acid (2).²⁴

Krygier et al.²⁵ reported 66.7% compound 2 lost after treatment with 2 M NaOH for 4 h under nitrogen atmosphere. To prevent loss of phenolic acids, Nardini et al.²⁴ proposed the addition of EDTA-ascorbate during alkaline hydrolysis. Under their assay conditions (2 M NaOH containing 10 mM EDTA and 1% ascorbic acid at 30 °C for 30 min), complete hydrolysis of compound 1 was achieved without any detectable loss of compound 2.²⁴

Preliminary studies showed significant loss of phenolic compounds during the alkaline hydrolysis of CP. Therefore, we decided to study the conditions of alkaline hydrolysis for recovery of HCAs from CP. The effect of different NaOH

concentrations (in the presence of EDTA and ascorbic acid) and incubation times on the recovery of HCAs was evaluated.

Figure 3 shows the time course of compound 2 extraction during alkaline hydrolysis of CP using different NaOH concentrations. We observed an increase in the amount of 2 extracted during the first minutes of the reaction, followed by a decrease of this compound. This can be explained by the existence of at least two reactions: first, a hydrolysis reaction that breaks the covalent bond linking compound 2 to a cell wall polymer, and then a second reaction that transforms compound 2 to another compound, presumably by oxidation. The greatest amount of 2 was obtained using 2 M NaOH and incubating for 2 h at 40 °C. Therefore, we used these conditions for the analytical procedure. To confirm the efficiency of alkaline hydrolysis, compound 1 was used as internal standard. We added a known amount of compound 1 to CP (1 mg/g of CP). Then we subjected the CP to an alkaline hydrolysis as described above. In the proposed conditions, 90% of the expected compound 2 was recovered.

HCA Content in CP from Different *C. arabica* Cultivars.

Information about the content and distribution of phenolic compounds in CP is often confusing and sometimes contradictory. Cultivar and degree of ripeness of the fruit can affect the content of phenolic compounds in CP. The ripening of coffee cherries occurs at the end of the physiological maturation of fruits. This process is characterized by a series of physical and chemical changes, such as increased weight and size and changes in color and in the content of sugars and phenolic compounds. Therefore, the ripening stage can significantly affect the HCAs content in CP samples.¹⁵ Therefore, we analyzed the content of soluble and bound HCAs in CP as a function of ripening and cultivar of *C. arabica*.

The content of HCAs strongly depends on the ripening stage and cultivar (Figure 4). Total HCA (defined as the sum of soluble and bound compounds 1–4) content increased during ripening of coffee fruit (from unripe to semiripe stage) for five cultivars. This is followed by a decrease in the HCA content at

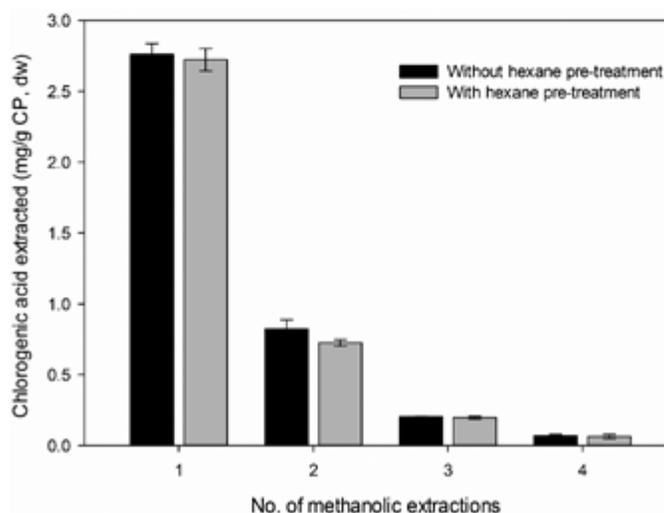


Figure 2. Extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by successive extractions with acidified aqueous methanol (data are presented as a mean value \pm standard deviation).

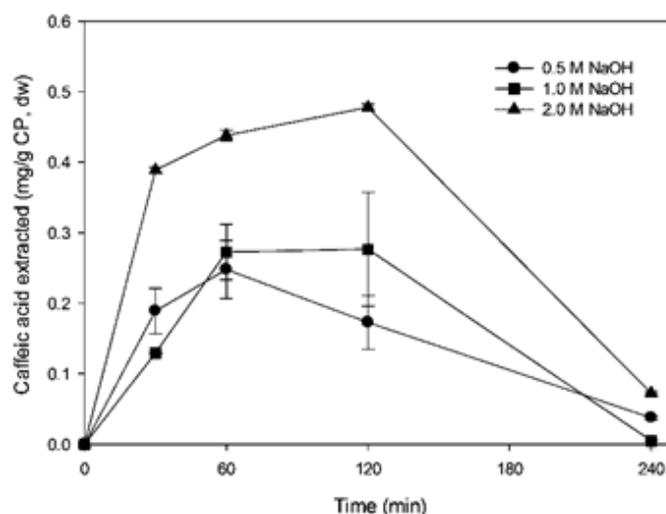


Figure 3. Time course of caffeic acid extraction during alkaline hydrolysis of coffee pulp with different concentrations of NaOH (in the presence of 1% ascorbic acid and 10 mM EDTA) (data are presented as a mean value \pm standard deviation).

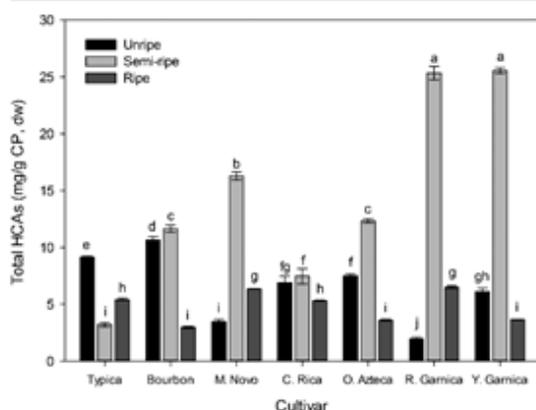


Figure 4. Content of total hydroxycinnamates in the pulp of coffee fruits from seven cultivars at three ripening stages (data are presented as a mean value \pm standard deviation).

the end of ripening for six cultivars. For the Typica cultivar an inverse trend was observed.

These observations are different from that of Koshiro et al.¹² They studied the content of compound **1** in pulp and seeds of fruits of *C. arabica* and *C. canephora* at five different ripening stages. They found a progressive increase of **1** during the ripening of coffee fruit. They explained this increase by the continuous synthesis of **1** as suggested by the expression of three genes related to the biosynthesis of compound **1**. These differences in the pattern of accumulation of HCAs can be explained by differences in the presentation of results. Koshiro et al.¹² expressed the content of HCAs as milligrams per fruit. When they took into account the growth of the fruit and expressed the content of HCAs as milligrams per gram of pericarp (dw), they did not observe any increase in the content of **1** during maturation of coffee cherries.

On the other hand, Miljkovic et al.²⁶ patented a process for the extraction of a nutraceutical product from whole coffee cherry. They recommended the use of unripe or semiripe cherries because these fruits had a higher content of phenolics and compound **1** (from 6.7 to 8.6% w/w of **1**) with respect to the ripe cherries (1.3% w/w of **1**). These results are in agreement with our findings.

Puertas-Mejía et al.²⁷ studied the accumulation of phenolic compounds in the pericarp (pulp) of coffee fruits at five ripening stages. They found a progressive increase of anthocyanins during ripening (from unripe to overripe stage). Nevertheless, the semiripe stage showed the highest antioxidant capacity. They associated this observation with the presence of additional components with antioxidant activity.²⁷ These findings could suggest that this additional antioxidant activity could be associated with the presence of HCAs. Nevertheless, no antioxidant assays were carried out in this work.

The content of total HCAs in CP significantly differs from cultivar to cultivar. However, these differences also depend on the ripening stage (Figure 4). For the pulp of ripe fruits, Red Garnica and Mundo Novo cultivars presented the highest content of total HCAs (from 6.34 to 6.49 mg/g dw), followed for the pulp of Typica and Costa Rica cultivars (from 5.29 to 5.42 mg/g dw), and the Yellow Garnica, Oro Azteca, and Bourbon varieties presented the lowest content of total HCAs (from 2.96 to 3.64 mg/g dw). For the semiripe coffee we observed that pulp from Yellow and Red Garnica cultivars had a remarkably high content of HCAs (from 25.32 to 25.54 mg/g dw); on the other hand, the Typica cultivar presented a low content of these compounds (3.20 mg/g dw). All other cultivars had a higher content of HCAs than any sample of pulp from ripe cherries (from 7.45 to 16.68 mg/g dw). Finally, unripe cherries of Bourbon and Typica cultivars presented the highest content of HCAs, whereas the Mundo Novo and Red Garnica had the lowest content of these compounds.

Other authors have studied the content of phenolic compounds in CP from different cultivars. However, those studies are limited to the methanolic extracts from the pulp of

Table 2. Content of Soluble Hydroxycinnamates in Coffee Pulp Samples (in Milligrams per Gram of Coffee Pulp, dw Basis)^a

cultivar	ripening stage	chlorogenic acid	caffeic acid	ferulic acid	p-coumaric acid	total soluble HCAs ^b	chlorogenic acid (%)
Typica	unripe	8.21 ± 0.07e	nd	0.18 ± 0.02ef	0.03 ± 0.00cdef	8.43 ± 0.08e	97.4
	semiripe	2.56 ± 0.18j	nd	0.06 ± 0.00j	0.02 ± 0.00efg	2.64 ± 0.19k	96.8
	ripe	4.59 ± 0.14i	nd	0.16 ± 0.00fgh	0.04 ± 0.00bc	4.79 ± 0.13j	95.9
Bourbon	unripe	9.77 ± 0.25d	nd	0.25 ± 0.00bc	0.04 ± 0.00bcde	10.05 ± 0.25d	97.1
	semiripe	10.84 ± 0.29c	nd	0.22 ± 0.02cd	0.05 ± 0.00abc	11.10 ± 0.32c	97.6
	ripe	2.26 ± 0.08j	nd	0.11 ± 0.00i	0.03 ± 0.00bcde	2.41 ± 0.09k	93.8
Mundo Novo	unripe	2.80 ± 0.17j	nd	0.02 ± 0.00k	0.03 ± 0.01bcde	2.85 ± 0.17k	98.2
	semiripe	15.27 ± 0.36b	nd	0.28 ± 0.01bc	0.05 ± 0.01abc	15.60 ± 0.37b	97.9
	ripe	5.56 ± 0.05gh	nd	0.16 ± 0.00fgh	0.04 ± 0.00bcd	5.76 ± 0.05hi	96.5
Costa Rica	unripe	6.08 ± 0.56fg	nd	0.14 ± 0.01hi	0.02 ± 0.00efg	6.23 ± 0.56fgh	97.5
	semiripe	6.70 ± 0.65f	nd	0.16 ± 0.00fgh	0.04 ± 0.03abc	6.91 ± 0.68f	97.0
	ripe	4.56 ± 0.05i	nd	0.17 ± 0.01fg	0.05 ± 0.00abc	4.78 ± 0.05j	95.4
Oro Azteca	unripe	6.62 ± 0.17f	nd	0.17 ± 0.01fg	0.02 ± 0.01efg	6.81 ± 0.17fg	97.2
	semiripe	11.45 ± 0.18c	nd	0.21 ± 0.00de	0.03 ± 0.00cde	11.69 ± 0.18c	97.9
	ripe	2.89 ± 0.09j	nd	0.15 ± 0.01ghi	0.04 ± 0.00bcde	3.07 ± 0.09k	94.0
Red Garnica	unripe	1.31 ± 0.15k	nd	0.04 ± 0.00jk	0.01 ± 0.00g	1.35 ± 0.15l	96.6
	semiripe	24.15 ± 0.62a	nd	0.39 ± 0.00a	0.06 ± 0.00a	24.60 ± 0.63a	98.2
	ripe	5.84 ± 0.13fgh	nd	0.04 ± 0.00jk	0.04 ± 0.00abc	5.93 ± 0.14ghi	98.5
Yellow Garnica	unripe	5.04 ± 0.36hi	nd	0.05 ± 0.00j	0.01 ± 0.00fg	5.11 ± 0.37ij	98.8
	semiripe	24.420 ± 0.256a	nd	0.42 ± 0.03a	0.05 ± 0.00ab	24.89 ± 0.28a	98.1
	ripe	3.01 ± 0.03j	nd	0.07 ± 0.00j	0.02 ± 0.00defg	3.10 ± 0.03k	97.2

^aData are presented as a mean value ± standard deviation; the same letter in a column means no significant differences (Tukey HDS test, $\alpha = 0.05$) between samples; values = 0.00 means = ≤ 0.005 ; nd, not detected. ^bCalculated as the sum of chlorogenic, caffeic, ferulic, and p-coumaric acids.

ripe cherries.^{8,9} They found a content of HCAs from 3.98 to 16.20 mg/g (dw) for cultivars of *C. arabica* and *C. canephora*. Those values are higher than the results obtained in this paper for ripe CP (from 2.96 to 6.49 mg/g dw). Differences between the contents of HCAs could be related to the origin of coffee fruits (soil, climate, etc.) and agricultural practices.

Tables 2 and 3 show the content of soluble and bound HCAs for each cultivar at each ripening stage, respectively. The content of soluble HCAs is higher than the bound HCAs for all analyzed samples. The content of soluble HCAs represents around 81–97% of total HCAs for all samples except for unripe Red Garnica (soluble HCAs = 68%). This observation differs from previous papers that indicate that most of the HCAs in CP are covalently bound to the cell wall polysaccharides.^{6,10,28}

Differences in distribution of soluble and bound HCAs can be related to the origin of the coffee fruits, ripening stage, extraction methodology, and number of consecutive extractions. Furthermore, under the extraction conditions, phenolic compounds may undergo different chemical reactions in the presence of the solvent used. This work has been shown that the amount of three consecutive extractions with aqueous methanol yields 98% of total compound **1** from CP (Figure 1).

In this paper, we confirmed the influence of cultivar and ripening on the content and distribution of soluble and bound HCAs, but we also observed that the extraction method affects the yields of these compounds. Thus, both fractions (soluble and bound) can be under- or overestimated when the extraction has been not exhaustive.

The main component of methanolic extracts of the seven cultivars was compound **1** (Table 2). Compound **1** represented

around 94–99% of soluble HCAs for all analyzed samples (from 1.31 to 24.42 mg/g dw). These values are higher than those reported by other authors.^{4,6,28} They found that **1** accounts for 80–84% of soluble HCAs. The content of **1** in the methanolic extracts of the pulp of ripe coffee cherries (2.2–5.8 mg/g dw) is within the range found by other authors.^{4,6,8,9} These authors have reported a content of 2.3–9.7 mg/g of CP as determined by HPLC analysis of methanolic extracts. On the other hand, Labat et al.²⁹ reported a content of **1** of 3.6–27.0 mg/g CP. However, they did not describe the extraction and analysis conditions; they neither reported the origin of the plant material.

There is very less information on the content of **1** (and HCAs) in CP from cherries at different stages of ripeness. Koshiro et al.¹² reported the evolution of **1** and its isomers in pulp and seeds of coffee fruits during ripening. They found a continuous decrease of compound **1** from 10 mg/g CP (dw) for green mature fruits to 5–5.5 mg/g for ripe cherries of *C. arabica* cv. Tall Mokka. A similar trend was observed for fruits of *C. canephora*, but in that case, the content of compound **1** decreased from 30 to 10 mg/g CP (dw). In our results a decrease in compound **1** was also observed from unripe to ripe fruits for five of seven cultivars. Nevertheless, in our case an increase of compound **1** was observed in the semiripe fruits for six of seven cultivars.

Other HCAs identified in methanolic extracts were ferulic acid (**3**) and p-coumaric acid (**4**). Compound **3** was found at highly variable concentrations (0.02–0.41 mg/g dw), whereas compound **4** was found in small amounts (0.01–0.06 mg/g dw). Compound **2** was not detected in methanolic extracts.

Table 3. Content of Bound Hydroxycinnamates in Coffee Pulp Samples (in Milligrams per Gram of Coffee Pulp, dw Basis)^a

cultivar	ripening stage	chlorogenic acid	caffeic acid	ferulic acid	p-coumaric acid	total bound HCAs ^b	caffeic acid (%)
Typica	unripe	0.06 ± 0.00c	0.64 ± 0.01b	0.03 ± 0.00cdef	0.03 ± 0.00cd	0.75 ± 0.02b	84.5
	semiripe	0.05 ± 0.00cd	0.45 ± 0.00fg	0.04 ± 0.00cd	0.02 ± 0.00ghijk	0.56 ± 0.00ijk	80.9
	ripe	0.08 ± 0.00a	0.47 ± 0.01f	0.04 ± 0.01b	0.03 ± 0.00cde	0.62 ± 0.02efgh	75.0
Bourbon	unripe	0.05 ± 0.00cd	0.54 ± 0.01e	0.02 ± 0.00jkl	0.02 ± 0.00kl	0.63 ± 0.01efg	85.4
	semiripe	0.05 ± 0.00cd	0.42 ± 0.01fghi	0.03 ± 0.00hijkl	0.02 ± 0.00ghijk	0.52 ± 0.00jk	81.0
	ripe	0.08 ± 0.00a	0.41 ± 0.01ghi	0.04 ± 0.00c	0.02 ± 0.00defghi	0.55 ± 0.01jk	73.4
Mundo Novo	unripe	0.04 ± 0.00d	0.54 ± 0.01e	0.03 ± 0.00defghi	0.02 ± 0.00defgh	0.64 ± 0.01efg	84.6
	semiripe	0.05 ± 0.01cd	0.58 ± 0.02cde	0.03 ± 0.00ijkl	0.02 ± 0.00hijk	0.67 ± 0.03cdef	85.5
	ripe	0.07 ± 0.00b	0.44 ± 0.01fg	0.04 ± 0.00cd	0.03 ± 0.00cde	0.58 ± 0.01ghij	76.7
Costa Rica	unripe	0.06 ± 0.00c	0.56 ± 0.02de	0.03 ± 0.00cde	0.03 ± 0.00ab	0.69 ± 0.02cde	81.6
	semiripe	0.05 ± 0.00cd	0.44 ± 0.01fg	0.03 ± 0.00ghijk	0.02 ± 0.00defg	0.54 ± 0.01jk	81.3
	ripe	0.08 ± 0.00a	0.37 ± 0.04i	0.04 ± 0.00cd	0.02 ± 0.00cdef	0.51 ± 0.04k	71.8
Oro Azteca	unripe	0.05 ± 0.00cd	0.61 ± 0.00bcd	0.03 ± 0.00fghij	0.02 ± 0.00defgh	0.71 ± 0.00bcd	85.4
	semiripe	0.04 ± 0.00d	0.53 ± 0.01e	0.02 ± 0.00kl	0.02 ± 0.00ijk	0.62 ± 0.01fghi	86.0
	ripe	0.08 ± 0.00a	0.38 ± 0.01hi	0.03 ± 0.00cdefg	0.02 ± 0.00efghijk	0.52 ± 0.01jk	73.0
Red Garnica	unripe	0.05 ± 0.00cd	0.53 ± 0.01e	0.03 ± 0.00cdefgh	0.03 ± 0.00bc	0.65 ± 0.02def	82.5
	semiripe	0.04 ± 0.00d	0.63 ± 0.02bc	0.02 ± 0.00jkl	0.02 ± 0.00jkl	0.72 ± 0.03bc	87.8
	ripe	0.06 ± 0.00c	0.45 ± 0.00fg	0.03 ± 0.00defghi	0.02 ± 0.00efghij	0.56 ± 0.00hijk	80.2
Yellow Garnica	unripe	0.05 ± 0.00cd	0.91 ± 0.05a	0.05 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	1.05 ± 0.05a	86.8
	semiripe	0.04 ± 0.00d	0.57 ± 0.01de	0.02 ± 0.00l	0.02 ± 0.00l	0.65 ± 0.02def	87.6
	ripe	0.05 ± 0.00cd	0.44 ± 0.02gh	0.03 ± 0.00efghij	0.02 ± 0.00ghijk	0.54 ± 0.02jk	80.7

^aData are presented as a mean value ± standard deviation; the same letter in a column means no significant differences (Tukey HDS test, $\alpha = 0.05$) between samples; values = 0.00 means ≤ 0.005 . ^bCalculated as the sum of chlorogenic, caffeic, ferulic, and p-coumaric acids.

The main component after the alkaline hydrolysis was **2**, and it represented around 72–88% of bound HCAs (Table 3). Compound **2** is the most abundant HCA found in fruits. It is commonly esterified to sugars, organic acids, and lipids.³⁰ Compound **1** was found to be principally in the form of soluble ester (**1**) in CP, but also a significant amount of this acid was in the form of insoluble esters.

A small amount of **1** was detected in alkaline hydrolysates, probably due to an incomplete hydrolysis of phenolic compounds. Compounds **2** and **3** were found in the range of 0.016–0.052 mg/g CP (dw). These values of bound phenolic acids are lower than those reported by Torres-Mancera et al.⁶ or Pérez-Morales et al.²⁸ They found contents of 0.083–0.108 mg of bound **3** and 0.079–0.094 mg of bound **2** per gram of CP (dw). These differences could be related to chemical differences between CP samples, maturity state, or the hydrolysis conditions such as time, temperature, and concentration as shown in Figure 3.

CP is a potential source of phenolic antioxidants and other bioactive compounds. However, available data of phenolic content in CP are widely variable. This study contributes to the understanding of the differences found in previous research on HCA extraction from CP. Furthermore, these findings suggest that unripe or semiripe coffee cherries, which are currently discarded as defective cherries, and fruits that remain on the coffee trees after harvest can be used as an inexpensive source of phenolic antioxidants, such as chlorogenic and caffeic acids.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Figures showing the results of morphological characterization of coffee fruits and chromatograms of reference compounds and selected samples. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(G.S.-C.) Phone: +52 55-58 04-4600. Fax: +52 55-580- 4499. E-mail: saucedo@xanum.uam.mx.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ABBREVIATIONS USED

CP, coffee pulp; HCAs, hydroxycinnamates; dw, dry weight

■ REFERENCES

- (1) Aranda, E.; Duran, L.; Escamilla, E. Vermicomposting in coffee cultivation. In *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*; Wintgens, J. N., Ed.; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Germany, 2004; pp 324–338.
- (2) Esquivel, P.; Jiménez, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Res. Int.* **2012**, *46*, 488–495.
- (3) Murthy, P. S.; Naidu, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – a review. *Resour. Conserv. Recycl.* **2012**, *66*, 45–58.
- (4) Ramirez-Coronel, M. A.; Marnet, N.; Kolli, V. S. K.; Roussos, S.; Guyot, S.; Augur, C. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-

- high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 1344–1349.
- (5) Mateos, R.; Goya, L.; Bravo, L. Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8724–8732.
- (6) Torres-Mancera, M. T.; Cordova-López, J.; Rodríguez-Serrano, G.; Roussos, S.; Ramírez-Coronel, M. A.; Favela-Torres, E.; Saucedo-Castañeda, G. Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technol. Biotechnol.* **2011**, *49*, 369–373.
- (7) Torres-Mancera, M. T.; Baqueiro-Peña, I.; Figueroa-Montero, A.; Rodríguez-Serrano, G.; González-Zamora, E.; Favela-Torres, E.; Saucedo-Castañeda, G. Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnol. Prog.* **2013**, *29*, 337–345.
- (8) Ramírez-Martínez, J. R. Phenolic compounds in coffee pulp: quantitative determination by HPLC. *J. Sci. Food Agric.* **1988**, *43*, 135–144.
- (9) Clifford, M. N.; Ramírez-Martínez, J. R. Phenols and caffeine in wet-processed coffee beans and coffee pulp. *Food Chem.* **1991**, *40*, 35–42.
- (10) Arellano-González, M. A.; Ramírez-Coronel, M. A.; Torres-Mancera, M. T.; Pérez-Morales, G. G.; Saucedo-Castañeda, G. Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea arabica*) pulp extracts. *Food Technol. Biotechnol.* **2011**, *49*, 374–378.
- (11) Bulanón, D. M.; Kataoka, T.; Ota, Y.; Hiroma, T. A color model for recognition of apples by a robotic harvesting system. *J. Jpn. Soc. Agric. Mach.* **2002**, *64*, 123–123.
- (12) Koshiro, Y.; Jackson, M.; Katahira, R.; Wang, M. L.; Nagai, C.; Ashihara, H. Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. *Z. Naturforsch., C: Biosci.* **2007**, *62*, 731–742.
- (13) Carvajal-Herrera, J. J.; Aristizábal-Torres, I. D.; Oliveros-Tascón, C. E. Evaluación de las propiedades físicas y mecánicas del fruto de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia) durante su desarrollo y maduración. *Dyna* **2012**, *79*, 116–124.
- (14) Geromel, C.; Ferreira, L. P.; Cavalari, A. A.; Pereira, L. F. P.; Guerreiro, S. M. C.; Vieira, L. G. E.; Leroy, T.; Mazzafera, P.; Marraccini, P. Sugar metabolism during coffee fruit development. *Proceedings of the 20th International Scientific Colloquium on Coffee*, Bangalore, India, Oct 11–15, 2004; International Scientific Association on Coffee: Paris, France, 2005; pp 651–655.
- (15) Marín-López, S. M.; Arcilla-Pulgarín, J.; Montoya-Restrepo, E. C.; Oliveros-Tascón, C. E. Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café *Coffea arabica* L. var. Colombia. *Cenicafé* **2003**, *54*, 208–225.
- (16) Aristizábal-Torres, I. D.; Carvajal-Herrera, J. J.; Oliveros-Tascón, C. E. Physical and mechanical properties correlation of coffee fruit (*Coffea arabica*) during its ripening. *Dyna* **2012**, *79*, 148–155.
- (17) Carvajal-Herrera, J. J.; Aristizábal-Torres, I. D.; Oliveros-Tascón, C. E.; Mejía-Montoya, J. W. Colorimetría del fruto de café (*Coffea arabica* L.) durante su desarrollo y maduración. *Rev. Fac. Nac. Agron. (Medellín, Colomb.)* **2011**, *64*, 6229–6240.
- (18) Ramos, P.; Valdés, C.; Gómez, E.; Sanz, J. R.; Solate, E. Características espectrales de la luz reflejada por frutos de café (*Coffea arabica*). *Rev. Colomb. Fis.* **2006**, *38*, 823–825.
- (19) Sandoval-Niño, Z. L.; Prieto-Ortiz, F. A. Caracterización de café cereza empleando técnicas de visión artificial. *Rev. Fac. Nac. Agron. (Medellín, Colomb.)* **2007**, *60*, 4105–4127.
- (20) Cárdenas, S. I. Caracterización morfológica y agronómica del grupo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE. M.Sc. thesis, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, 2007.
- (21) Hernández, B.; Sáenz, C.; Alberdi, C.; Alfonso, S.; Berroqui, M.; Diñeiro, J. M. Design and performance of a color chart based in digitally processed images for sensory evaluation of piquillo peppers (*Capsicum annuum*). *Color Res. Appl.* **2004**, *29*, 305–311.
- (22) De Castro, R. D.; Marraccini, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, *18*, 175–199.
- (23) Pérez-Jiménez, J.; Torres, J. L. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 12713–12724.
- (24) Nardini, M.; Cirillo, E.; Natella, F.; Mencarelli, D.; Comisso, A.; Scaccini, C. Detection of bound phenolic acids: prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chem.* **2002**, *79*, 119–124.
- (25) Krygier, K.; Sosulski, F.; Hoggs, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. I. Extraction and purification procedure. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 330–334.
- (26) Miljkovic, D.; Duell, B.; Miljkovic, V. Methods for coffee cherry products. U.S. Patent 7,754,263, July 13, 2010.
- (27) Puertas-Mejía, M. A.; Rivera-Echeverry, F.; Villegas-Guzmán, P.; Rojano, B. A.; Pelaez-Jaramillo, C. Comparación entre el estado de maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L.), el contenido de antocianinas y su capacidad antioxidante. *Rev. Cubana Plant. Med.* **2012**, *17*, 1–7.
- (28) Pérez-Morales, G. G.; Ramírez-Coronel, A.; Guzmán-López, O.; Cruz-Sosa, F.; Perraud-Gaime, I.; Roussos, S.; Saucedo-Castañeda, G. Feruloyl esterase activity from coffee pulp in solid-state fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* **2011**, *49*, 352–358.
- (29) Labat, M.; Augur, C.; Rio, B.; Perraud-Gaime, I.; Sayad, S. Biotechnological potentialities of coffee and similar with olive, two models of agroindustrial products rich in polyphenolic compounds: a review. In *Coffee Biotechnology and Quality*; Sera, T.; Soccol, C. R., Pandey, A., Roussos, S., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2000; pp 517–531.
- (30) Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2073S–2085S.



Contents lists available at ScienceDirect

Bioresource Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biortech

Review

Review on technological and scientific aspects of feruloyl esterases: A versatile enzyme for biorefining of biomass

Nishant Gopalan^{a,b}, L.V. Rodríguez-Duran^c, G. Saucedo-Castaneda^c, K. Madhavan Nampoothiri^{a,b,*}^aBiotechnology Division, CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology, Thiruvananthapuram 695019, Kerala, India^bAcademy of Scientific and Innovative Research (AcSIR), CSIR, New Delhi, India^cMetropolitan Autonomous University Campus Iztapalapa, Biotechnology Department, Mexico City, Iztapalapa Z.C. 09340, Mexico

HIGHLIGHTS

- Feruloyl esterases release hydroxycinnamates from lignocellulosic biomass.
- Enzymatic extraction of hydroxycinnamates from less explored agroresidual biomass.
- Hydroxycinnamates as value added chemicals for a cost effective biorefinery.
- Molecular cloning of feruloyl esterase for enzymatic process.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2015

Received in revised form 22 June 2015

Accepted 23 June 2015

Available online 29 June 2015

Keywords:

Biorefinery

Agro residual biomass

Enzymatic extraction

Feruloyl esterase

Ferulic acid

ABSTRACT

With increasing focus on sustainable energy, bio-refining from lignocellulosic biomass has become a thrust area of research. With most of the works being focused on biofuels, significant efforts are also being directed towards other value added products. Feruloyl esterases (EC 3.1.1.73) can be used as a tool for bio-refining of lignocellulosic material for the recovery and purification of ferulic acid and related hydroxycinnamic acids ubiquitously found in the plant cell wall. More and more genes coding for feruloyl esterases have been mined out from various sources to allow efficient enzymatic release of ferulic acid and allied hydroxycinnamic acids (HCAs) from plant-based biomass. A sum up on enzymatic extraction of HCAs and its recovery from less explored agro residual by-products is still a missing link and this review brushes up the achieved landmarks so far in this direction and also covers a detailed patent search on this biomass refining enzyme.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Hydroxycinnamic acids (HCAs) are components of plant cell walls. These compounds exhibit various biological activities which are of interest to the pharmaceutical industry, making them high-value chemicals. HCAs like ferulic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid, etc. (Fig. 1) have excellent antioxidative properties, due to the presence of the para hydroxy group on the phenolic acid moiety. These compounds can form stable phenoxy moieties thus serving as good antioxidants, the unsaturation of the aliphatic side chain and its bulk also assists in the antioxidant activity of these compounds (Razzaghi-Asl et al., 2013).

* Corresponding author at: Biotechnology Division, CSIR-National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (NIIST), Trivandrum 695 019, India. Tel.: +91 0471 2515366.

E-mail address: madhavan85@hotmail.com (K.M. Nampoothiri).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.117>

0960-8524/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

HCAs may occur as free phenolic acids, as soluble conjugates or covalently linked to cell wall polymers (Figs. 2 and 3). Ferulic acid is the most plentiful HCA in nature, and it is found mainly linked to hemicellulosic carbohydrate moieties and to lignin components (Manach et al., 2004; Shahidi and Chandrasekara, 2010).

HCAs have absorption maxima in the UV-B range, from 310 to 360 nm, which also makes these compounds useful in the preparation of skinceuticals. HCAs have been indicated as beneficial for clinical conditions like Alzheimer's and is known to be a protective agent against colon cancers. Ferulic acid is also used as precursors for biotransformation into vanillin. Caffeic acid and its phenethyl esters have been identified as the active pharmaceutical component of propolis (Russo et al., 2002).

Release of HCAs from plant material is typically facilitated by alkaline hydrolysis of the plant-derived biomass. Alkaline hydrolysis is not preferred, and green methods akin to enzymatic

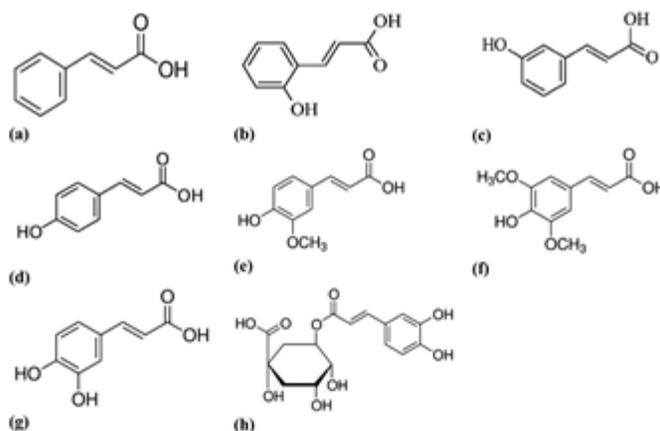


Fig. 1. Cinnamic and hydroxycinnamic acids. (a) Cinnamic acid, (b) o-coumaric acid, (c) m-coumaric acid, (d) p-coumaric acid, (e) ferulic acid, (f) sinapinic acid, (g) caffeic acid, (h) chlorogenic acid.

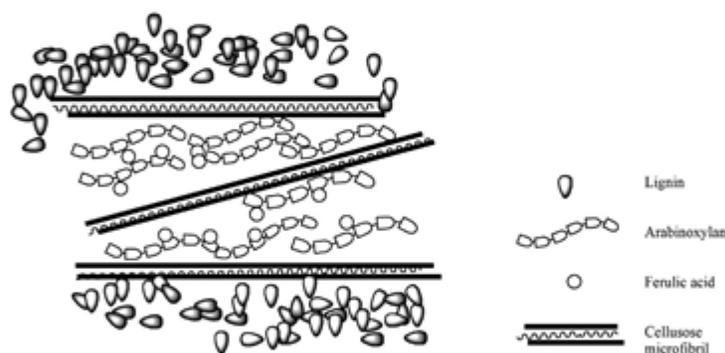


Fig. 2. Positioning of ferulic acid in lignocellulosic biomass.

hydrolysis have better acceptability. These methods are more specific for HCAs and therefore only release specific products without damaging other valuable chemicals like furfurals that are destroyed during alkaline extraction (Mathew and Abraham, 2004; Wu et al., 2012).

With the looming fuel crisis, cutting edge research is focused on fuel production from lignocellulosic biomass. Second generation bioethanol is one of the major thrust areas. The technology involves the breakdown of lignocellulosic materials into component sugars that can be then converted into ethanol via the fermentative route. The breakdown of lignocellulosic biomass requires the use of various carbohydrate degrading enzymes like cellulases and hemicellulases. Feruloyl esterases (FAEs) are hemicellulase accessory enzymes that do not release sugars directly, however, make it better available for carbohydrate binding enzymes. The process currently is not economical enough to replace automobile fuels (Menon and Rao, 2012). To bring down the cost of fuel ethanol subsidiary processes or by-products of high-value must be spun out, more akin to a petroleum refinery, and hence the process is claimed to be biorefining.

HCAs like ferulic acid, p-coumaric acid, chlorogenic acid, caffeic acid, etc. are low-volume, high-value products that can help bridge this economic gap. HCAs are ubiquitously present in plant material; however, the distribution of these compounds is varied. By-products of first generation ethanolic fermentations as a fuel (maize) or as a drink (wheat/barley) can be used as a source of HCAs. Releasing HCAs from the animal fodder of monogastric animals, as well as ruminants increases the digestibility and hence the nutrient quality of the feed. The extracted biomass may, therefore, be used as forage feedstock (Harholt et al., 2010).

2. Classification and sources of FAE

FAEs are a subclass of the carboxylic acid esterases that are able to hydrolyse the ester bond between HCAs and sugars present in the plant cell walls. FAEs were classified into 4 groups (type-A, B, C and D) by Crepin et al. (2004b) based on substrate utilisation data and supported by primary sequence identity. Type A FAEs show preference for the phenolic moiety of the substrate that contains methoxy substitutions, especially at meta-position, as occurs in

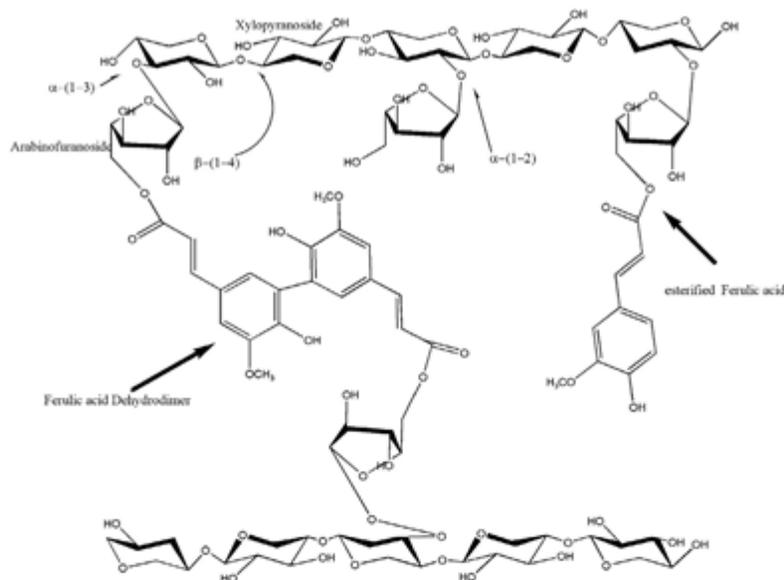


Fig. 3. Linkages for Arabinoxylose feruloyl.

ferulic and sinapinic acids. Type B FAEs shows preference to substrates containing one or two hydroxyl substitutions as found in *p*-coumaric or caffeic acid. Type A and D FAEs are able to release low quantities of diferulates. Type C and D FAEs exhibit broad specificity against synthetic HCA esters (methyl sinapate and methyl *p*-coumarate and methyl caffeate) showing difference only in the ability to release diferulates. Type A FAEs are active only on substrates containing FA ester linked to the O-5 and not on substrates containing ferulic acid ester linked to the O-2 linkages of α arabinofuranose. Type B FAEs are active on substrates containing FA ester linked to both O-5 and O-2 of α arabinofuranose. Type C and D FAEs are able to hydrolyse both linkages (Crepin et al., 2004b; Topakas et al., 2007). This empirical classification into four groups has been further expanded and improved (Benoit et al., 2008; Udatha et al., 2011). However, it continues being widely used in scientific papers.

Extensive study by Udatha et al. (2011) has led to the classification of FAEs into 12 distinct families. The improved distinction was possible through the use of descriptor based classification and machine learning algorithms. This classification system does not contradict but expands the knowledge in the area and allows a systematic understanding of the mode of action of FAE.

Extensive research for finding FAEs that release greater amounts of alkali releasable HCAs has led to a wide variety of

organisms and enzymes. *Aspergilli* have been found to have FAEs that are effective in releasing HCAs in various species. Anaerobic fungi and bacteria have also been employed for mining FAEs. These include fungi like *Phycomyces equi*, *Anaeromyces mucronatus*, *Neocallimastix* spp, *Orpinomyces*, *Clostridium stercorarium*, *Clostridium thermoceillum*, etc. (Blum et al., 2000; Borneman et al., 1990, 1992; Donaghy et al., 2000; Fillingham et al., 1999; Qi et al., 2011). FAEs are extensively prevalent in ascomycota and recently a study based on the information provided by FAE sequences in ascomycota found the enzyme sequences phylogenetically important (Olivares-Hernández et al., 2010).

3. Production of FAEs

FAE is produced by filamentous fungi or bacteria in submerged fermentation and also by solid state fermentation. Culture media usually contain soluble ferulic acid esters (methyl or ethyl ferulate) or agro industrial waste rich in bound ferulic acid (e.g. wheat bran, oat spelt xylan, sugar beet pulp) as the carbon source and enzyme inducer. Under these conditions, titres of very low activity have been obtained (usually less than 1 U/ml of culture medium) (Bonnina et al., 2001; Faulds and Williamson, 1994; Mukherjee et al., 2007; Shin and Chen, 2006).

Table 1
Comparative production of FAE in solid state and submerged fermentation.

Microorganism	Substrate/support	Fermentation system	Activity (U/g ds ^a)	Productivity (U/g ds d)	Reference
<i>A. niger</i> I-1472	Sugar beet pulp	Submerged fermentation	0.302	0.075	Asther et al. (2002)
<i>A. niger</i> I-1472	Sugar beet pulp	Solid state fermentation	0.392	0.097	Asther et al. (2002)
<i>A. niger</i> I-1472	Sugar beet pulp	Submerged fermentation	0.133	0.022	Asther et al. (2002)
<i>A. niger</i> I-1472	Sugar beet pulp	Solid state fermentation	0.583	0.096	Asther et al. (2002)
<i>A. niger</i> CFR 1105	Wheat bran	Submerged fermentation	31.54	6.3	Hegde and Muralikrishna (2009)
<i>A. niger</i> CFR 1105	Wheat bran	Solid state fermentation	32.54	8.1	Hegde and Muralikrishna (2009)

1. ds = dry substrate; 2. Measured against methyl ferulate; 3. Measured against methyl caffeate; 4. Measured against 4-nitrophenyl ferulate.

3.1. Production of FAEs in solid state fermentation

To enhance the production of FAE, several researchers have evaluated the use of solid-state fermentation. Solid-state fermentation has several advantages over submerged fermentation for the production of certain enzymes. These advantages include higher enzyme titres and higher productivity, low level of catabolic repression and increased stability of the excreted enzymes. Furthermore, solid-state fermentation allows the use of agro-industrial wastes as and support carbon source (Table 1). Comparative production of FAE in solid state and submerged fermentation in few cases were shown in Table 1. Asther et al. (2002) compared the production of FAE by *Aspergillus niger* I-1472 in solid-state fermentation and submerged culture conditions using sugar beet pulp as support and carbon source. Maximal activity was reached around 4 days of incubation. Activities against methyl-sinapate and methyl-ferulate did not significantly differ in liquid and solid fermentation. However, when methyl caffeate and methyl *p*-coumarate were used as substrates, activities were significantly higher in solid-state fermentation. These observations indicated the induction of at least two esterases with different substrate specificity. Hegde and Muralikrishna (2009) studied the production of FAE by *A. niger* CFR 1105 grown in solid-state and submerged fermentation, using wheat bran as a carbon source and inducer of the enzyme were studied. Maximum activity titres were similar in solid-state and submerged fermentations (32.5 and 31.5 U/g dry wheat bran, respectively), but the highest FAE activity was reached a day earlier (4 days) in solid-state fermentation than submerged fermentation.

3.2. Molecular cloning of FAE for enzymatic process

Record et al. (2003) constructed a vector containing the cDNA encoding *A. niger* FAE A with its signal peptide and used it to transform a protease deficient *A. niger* strain. Using glucose as carbon source (60 g/L) the transformed strain produced 20.6 nkat/ml of FAE. This enzyme was easily purified and used for wheat straw pulp bleaching. Levasseur et al. (2004) inserted the *faeB* gene from *A. niger* BRFM13 into an expression vector under the control of the *gpd* promoter and expressed in a protease deficient *A. niger* strain. This homologous overproduction system allowed reaching a FAE activity of 18 nkat/ml, 16-fold higher as compared to the production with non-transformed *A. niger* strain induced by sugar beet pulp.

There have been few reports of FAEs from different sources being cloned heterologously or otherwise and used for characterizing the property of the enzyme with respect to enzymatic release capacity of the same from different agro by-products. Levasseur et al. (2006) constructed a chimeric enzyme, consisting of the *AnFaeA* and *Trichoderma reesei* swollenin. It was expressed in *T. reesei* Rut30 and CL847 strains. The pure form of the enzyme was not as effective as the complete extracellular component of the chimeric protein expressed in CL847 strain, which could release 45% of total alkali releasable ferulic acids from de starched wheat bran. FAEZ a part of a xylanase enzyme in *C. thermocellum* was expressed in *Escherichia coli* and used to release ferulic acid from defatted jojoba meal, with about 1.8 U of the enzyme, 76% of the total ferulic acid was released by 24 h (Laszlo et al., 2006). *Thermoanaerobacter tengcongensis* *TtFaeA* was expressed in *E. coli* and used to release ferulic acid from triticale bran. The enzyme was thermostable up to 80 °C and released 30% of ferulic acid using approx 0.8 U/g as enzyme loading and solid loading of 5% wt/vol. The reaction mixture was initially treated with 10 U of xylanase initially at 37 °C for 16 h, followed by the action of the FAE at 55 °C for 5 h (Abokitse et al., 2010). In a study by Wong et al. (2011), cloned and expressed *AnfaeA* gene from *A. niger* into *Saccharomyces cerevisiae* and the extracellular fraction of the yeast in YMB medium was able to release about 3.0 µg/100 mg of ferulic acid from switchgrass (total releasable ferulic acid 2 mg/g). A landmark publication for FAEs from bacterial origin was published, with the bacterial enzymes being able to release high amounts of ferulic acid and *p*-coumaric acid from triticale bran, de starched wheat bran and even condensate of steam exploded wheat straw. The *Sorangium cellulosum* FAEs *ScFae1* and *ScFae2* were cloned into *E. coli* cells and were purified. The maximal release of ferulic acid from triticale bran of 96% was observed, when 0.45 U/ml of the enzyme *ScFae2* was incubated with 5.3 U/ml of xylanase to triticale bran suspension of 5%, within 3 h of incubation at 37 °C with shaking at 200 rpm (Wu et al., 2012).

4. Potential biomasses for the enzymatic extraction of HCAs

HCAs are widely distributed plant secondary metabolites. These compounds occur in the free, soluble-bound and insoluble-bound forms (Shahidi and Chandrasekara, 2010). Ferulic acid is the most abundant hydroxycinnamic acid and it is rarely found in the free form. In monocots, ferulic acid is covalently bound to cell wall

Table 2
Phenolic acid content of various biomasses.

Biomass	Phenolic acid content	Reference
Sugar beet pulp	Ferulic acid – 6.4 mg/g	Benoit et al. (2006)
Maize bran	Ferulic acid – 31.22 mg/g <i>p</i> -Coumaric acid – 3.12 mg/g	Benoit et al. (2006)
Steam exploded wheat straw	Ferulic acid – 1.35 mg/g <i>p</i> -Coumaric acid – 2.13 mg/g	Benoit et al. (2006)
Apple marc	Caffeic acid 0.33 mg/g	Benoit et al. (2006)
Coffee pulp	<i>p</i> -Coumaric acid – 0.27 mg/g Ferulic acid – 0.24 mg/g Caffeic acid – 2.66 mg/g <i>p</i> -Coumaric acid – 0.08 mg/g	Benoit et al. (2006)
Triticale bran	Ferulic acid – 2.22 mg/g	Wu et al. (2012)
Corn fibre	Ferulic acid – 18.4 mg/g	Mathew and Abraham (2004)
Corn bran	Ferulic acid – 32.2 mg/g	Mathew and Abraham (2004)
Wheat bran	Ferulic acid – 4 mg/g	Xie et al. (2010)
De starched maize bran	Ferulic acid – 20.85 mg/g	Kumar et al. (2013)
Rice bran	Ferulic acid – 33 mg/g	Schmidt et al. (2014)
Sugarcane baggase	Ferulic acid – 1.4 mg/g <i>p</i> -Coumaric acid – 1.5 mg/g	Damásio et al. (2013)
Sweet potato (<i>Ipomea batatas</i>)	Ferulic acid – ~22 mg/g	Min et al. (2006)
Jojoba meal	Ferulic acid – 9.1 mg/g	Laszlo et al. (2006)

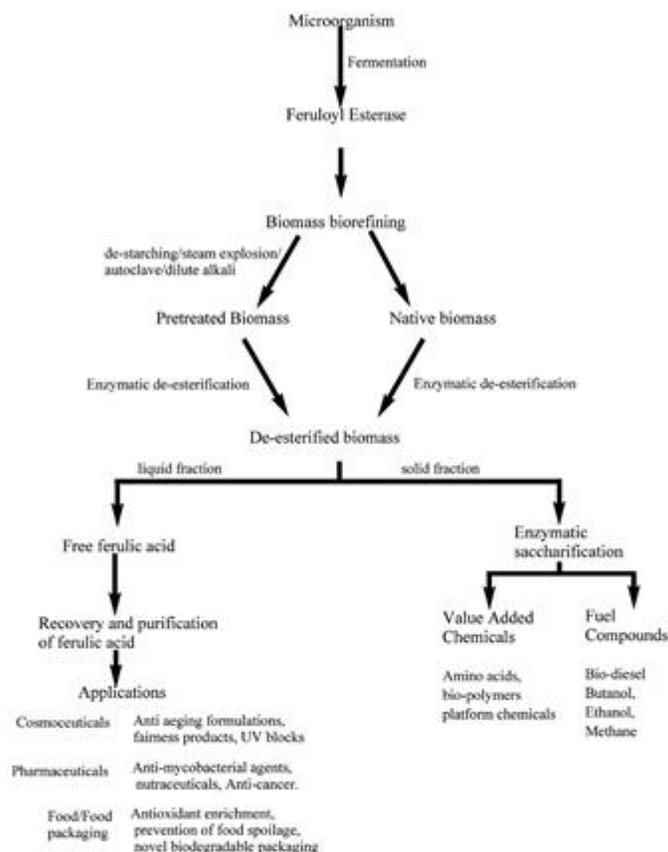


Fig. 4. Biorefining with feruloyl esterase – schematic presentation.

polymers by either ester bonds through its carboxylic acid group with the C5-hydroxyl of α -D-arabinosyl side chains of xylans or via ether bonds to lignin. In dicots, ferulic acid is associated with pectin via ester linkages to the C-2 hydroxyl group of arabinofuranose or the C-6 hydroxyl group of galactopyranose residues. Ferulic acid form dimers, either dehydrodimers or cyclobutane type dimers. Diferulates may act as cross links between polysaccharides and lignin (Buanafina, 2009; Hatfield et al., 1999; Kroon and Williamson, 1999). Linkages for Arabinoxylose feruloyl is shown in Fig. 3.

HCAs and derivatives are found in all commelinoid groups of plants including Arecales, Commelinales, Poales, and Zingiberales. Most of the monocot grasses have abundant hydroxycinnamate residues cross-linked to the cell wall carbohydrates. Many cereal brans have very high concentrations of ferulic acid and related HCAs and are used as a starting material for enzymatic extraction of ferulic and allied HCAs. Grasses like switchgrass, sugarcane bagasse, wheat straw, barley straw (Qi et al., 2011) have been known to be used for the enzymatic release of HCAs. Among bran substrates, maize/corn bran has the highest amount of esterified ferulic acid content (30 mg/g), while de starched wheat bran can have compositions ranging from 4 to 6 mg/g (Benoit et al., 2006; Faulds et al., 2004; Topakas et al., 2004).

De starched wheat bran is even used as a substrate to measure the enzyme activity of FAE. Apart from wheat bran other synthetic substrates like methyl and ethyl ferulate, methyl sinapate, methyl *p*-coumarate, methyl caffeate are also used as substrates for analysing the FAE activity (Couteau et al., 2001). Steam exploded wheat straw is a source of *p*-coumaric acid, with 2.13 mg/g and ferulic acid at 1.35 mg/g (Benoit et al., 2006; Wu et al., 2012). Sugarcane bagasse also contains *p*-coumaric acid and ferulic acid (Xu et al., 2005). Rice bran and triticale bran both have been used as substrates for the enzymatic release of ferulic acid. Rice bran is known to have ferulic acids about 0.9 mg/g, and triticale bran has 2.2 mg/g esterified ferulic acids (Mathew and Abraham, 2004; Wu et al., 2012). Brewers spent grain is also a valuable source as a substrate for the enzymatic release of ferulic acids, along with oat hulls (Crepin et al., 2004a; Yu et al., 2004).

Caffeic acid is the most abundant HCA in fruits, and it is present mainly in the form of soluble conjugates. Caffeic acid is commonly found as esters of organic acids such as quinic, shikimic and tartaric acids (Manach et al., 2004). Apple marc and coffee pulp have been shown to be a valuable source of chlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid. Coffee pulp has significant amounts of chlorogenic acids, (~2.6 mg/g) while apple cider processing facilities have chlorogenic acid about 0.5 mg/g (Benoit et al., 2006;

Table 3
Patent applications and granted patents on FAEs from 2000 onwards.

Patent number	Applicant	Title
WO200212472	Novozymes AS [DK] Novo Nordisk AS [DK]	Stereoselective esterase from <i>Aspergillus oryzae</i>
WO2004009804	Biocatalysts Ltd [GB] University of Nottingham [GB] Institute of Food Research [GB]	Feruloyl esterase and uses thereof
EP1913136	Institut National de la Recherche Agronomique [FR] Institut Français du Pétrole [FR]	Fused protein containing plant cell wall-destroying enzymes and use thereof
US2010047320	McGill University [CA]	Oral polymeric membrane feruloyl esterase producing bacteria formulation
WO2008116319	McGill University [CA]	Bioproduction of ferulic acid and uses thereof
GB2324302	Biotechnology and Biological Sciences Research Council [GB] University of Newcastle [GB]	Phenolic acid esterase
US2010256353	Biocatalysts Ltd [GB]	Use of type C and D feruloyl esterases in the manufacture of biofuels
RU2358756	Ooo Npk Fermentek [RU]	Method of producing enzymatic agent for degradation of hemicellulose heteropolysaccharides of herbal cytoderm and enzymatic agent
US8034995	Novozymes AS [DK]	Polypeptides having feruloyl esterase activity and polynucleotides encoding same
CN101228921	China Agricultural University [CN]	Compound feruloyl esterase additive for feed and using method thereof
US8058513	Novozymes Inc [US]	Polypeptides having feruloyl esterase activity and polynucleotides encoding same
US8609933	Novozymes Inc [US]	Polypeptides having feruloyl esterase activity and polynucleotides encoding same
US8637292	Novozymes AS [DK]	Polypeptides having esterase activity and nucleic acids encoding the same
CN101482700	Jianshe Wang [CN]	Intensive processing method for stalk articles or agricultural castoff
CN102002508	Jilin University [CN]	Feruloyl esterase, code gene and application thereof
CN102190586	Chengdu Institute of Biology [CN] Chinese Academy of Sciences [CN]	Two new compounds for enzyme activity assays of feruloyl esterase, and preparation methods thereof
CN102220299	Chengdu Institute of Biology [CN] Chinese Academy of Sciences [CN]	Feruloyl esterase A mutant and purpose thereof
CN102286442	Zhejiang University [CN]	Method for producing feruloyl esterase by fermentation of <i>Aspergillus fumigatus</i>
CN102605021	Tianjin Modern Vocational Technology College [CN]	Method for preparing xylo-oligosaccharide syrup and powdered sugar by using complex enzyme
CN102676468	Shandong Agricultural University [CN]	Feruloyl esterase PCFAE2 from <i>Phytophthora capsici</i> coding gene and application
CN102703402	Shandong Agricultural University [CN]	Feruloyl esterase PCFAE1 from <i>Phytophthora capsici</i> , coding gene and application thereof
CN102703403	Jiangnan University [CN]	Cloning of feruloyl esterase gene (Fae-A) and preparation of recombinant enzyme
CN102796670	Zhejiang University [CN]	<i>Aspergillus niger</i> strain and application thereof
WO2014020141	Dupont Nutrition Biosciences APS [DK]	Feed additive composition
CN102864180	Huaqiao University [CN]	Method for simultaneously preparing ferulic acid, xylo-oligosaccharides and ethanol from spent grains
CN102796673	Yellow River Delta Chambroad Research Institute of Chemical Industry Co. Ltd [CN] Shandong Jingbo Holdings Co., Ltd. [CN]	Feruloyl esterase production strain and method for producing feruloyl esterase by using same
CN102888388	Zhejiang University [CN]	Method for producing feruloyl esterase by solid fermentation
CN102894228	Huaqiao University [CN]	Broiler chicken feed
CN102978180	Jiangnan University [CN]	Clone and expression of <i>Aspergillus oryzae</i> feruloyl esterase gene (FaeA)
CN103061181	Yellow River Delta Chambroad Research Institute of Chemical Industry Co. Ltd [CN]	Complex enzyme preparation and technique for preparing dissolving pulp by using same
CN103074314	Zhejiang University [CN]	Method for producing feruloyl esterase through <i>Aspergillus niger</i> fermentation
WO2014135063	Novozymes AS [DK]	Milling process
CN103320496	Northwest A & F University [CN]	Method for detecting activity of feruloyl esterase of anaerobic fungi
CN103789357	Qilu University of Technology [CN]	Method for producing 4-vinyl guaiacol by fermenting <i>Bacillus circulans</i>
CN103642850	Jiangnan University [CN]	Determination method of ferulic acid antioxidant activity in vitro

Torres-Mancera et al., 2013). Classically, sugar beet pulp has been used for the production of FAEs and is also used as a substrate for the enzymatic release of free ferulic acid. Sugar beet pulp can have as much as 6 mg/g of total alkaline extractable ferulic acid (Benoit et al., 2006).

Other sources of HCAs includes grape skin, ryegrass, cornstalks and sweet potato stems. Sweet potato a tuber that is consumed in Asian countries has considerably high amounts of ferulic acid (Min et al., 2006). Corn stalk has 20 mg/g of *p*-coumaric acid, has not been exploited as much as other corn wastes (Yang et al., 2009). Corn fibre obtained after saccharification of corn kernel for ethanol production is like brewers spent grain and this has also been used as a substrate for the enzymatic extraction of HCAs. These are less explored substrates and must be studied better. Table 2 summarizes phenolic acid content of various biomasses.

5. Pre-treatment of vegetal biomass

All of the above-mentioned sources are by-products, with very little economic value. Many of these can be used as feedstock for

lignocellulosic bioethanol. Generating maximal level of high-value phenolic acids through enzymatic recovery is therefore of priority. A schematic presentation of the biorefining with feruloyl esterase is shown in Fig. 4. The feedstock may be used directly or with some applied pre-treatment. Pre-treatment technologies have been used with lignocellulosic biomass for improving the saccharification of the feedstock used. Pre-treatment techniques apart from de starching the biomass are hardly used to improve the enzymatic release of these phenolic acids.

Faulds et al. (2006) gave a very prominent example of the same when alkali pre-treated wheat bran was used as a substrate for the enzymatic release of ferulic and related phenolic acids. Other methods of pre-treatments that have been used for improving the enzymatic accessibility of FAEs include steam explosion. Steam explosion involves sudden decompression of hot steam and biomass, and may produce smaller oligosaccharides that are easily accessible to the enzymatic machinery. This phenomenon, therefore, helps in the release of bound phenolic acids (Wu et al., 2012).

Reports have been published on the expression of fungal FAEs in plant systems, so as to decrease the phenolic acid esterification in

Table 4
Enzymatic extraction of HCAs from plant material.

Biomass	Enzyme	Phenolic acid	Efficiency (%)	Reference
Sugar beet pulp	<i>A. niger</i> crude extract	Ferulic acid	70	Bonnin et al. (2002)
Autoclaved maize bran	<i>A. niger</i> crude extract	Ferulic acid	95.5	Bonnin et al. (2002)
Wheat bran	<i>P. funiculosus</i> FAE B + <i>Trichoderma viride</i> xylanase	Ferulic acid	98	Kroon et al. (2000)
Wheat bran	<i>Talaromyces stipitatus</i> FAE C	Ferulic acid	1.5	García-Conesa et al. (2004)
66%	<i>Talaromyces stipitatus</i> FAE C + <i>Trichoderma viride</i> xylanase	Ferulic acid		García-Conesa et al. (2004)
Sugar beet pulp	<i>Talaromyces stipitatus</i> FAE C	Ferulic acid	5.8	García-Conesa et al. (2004)
Sugar beet pulp	<i>Talaromyces stipitatus</i> FAE C + <i>A. niger</i> endo-arabinanase and α -L-arabinofuranosidase	Ferulic acid	20	García-Conesa et al. (2004)
De starched wheat bran	<i>Sporotrichum thermophile</i> FAE	Ferulic acid	0.7	Topakas et al. (2004)
De starched wheat bran	<i>Sporotrichum thermophile</i> FAE + xylanase	Ferulic acid	33	Topakas et al. (2004)
Wheat bran	<i>Humicola insolens</i> commercial enzyme	Ferulic acid	83	Faulds et al. (2004)
		5,5' diferulic acid	61	
		8-O-4' diferulic acid	44	
		8,5' diferulic acid	69	
		p-Coumaric acid	88	
Brewer's spent grain	<i>Humicola insolens</i> commercial enzyme	Ferulic acid	76	Faulds et al. (2004)
		5,5' diferulic acid	71	
		8-O-4' diferulic acid	73	
		8,5' diferulic acid	0	
		p-coumaric acid	40	
Oat hulls	Food grade <i>A. niger</i> feruloyl esterase and <i>Trichoderma</i> xylanase	Ferulic acid	50	Yu et al. (2004)
		p-Coumaric acid	4.8	
Corn bran	<i>Fusarium proliferatum</i> FAE B + xylanase	Ferulic acid	32	Shin and Chen (2006)
Corn bran	<i>Neosartorya spinosa</i> crude enzyme	Ferulic acid	100	Shin et al. (2006)
Coffee pulp	<i>A. niger</i> FAE B	Caffeic acid	100	Benoit et al. (2006)
		p-Coumaric acid	73	
Apple marc	<i>A. niger</i> FAE B	Caffeic acid	83	Benoit et al. (2006)
		p-Coumaric acid	34	
Steam-exploded wheat straw	<i>A. niger</i> FAE B	p-Coumaric acid	16	Benoit et al. (2006)
		Ferulic acid	58	
Autoclaved maize bran	<i>A. niger</i> FAE A	Ferulic acid	40	Benoit et al. (2006)
Autoclaved maize bran	<i>A. niger</i> FAE B	Ferulic acid	8	Benoit et al. (2006)
Sugar beet pulp	<i>A. niger</i> FAE A	Ferulic acid	0	Benoit et al. (2006)
Sugar beet pulp	<i>A. niger</i> FAE B	Ferulic acid	8	Benoit et al. (2006)
Sugar beet pulp	<i>Streptomyces tendae</i> crude extract	Ferulic acid	10	Ferreira et al. (2007)
Maize bran	<i>Neoclimastix</i> sp. crude enzyme	Ferulic acid	8	Yang et al. (2009)
		p-Coumaric acid	69	
Maize bran	<i>Anaeromyces</i> sp. crude extract	Ferulic acid	2	Yang et al. (2009)
		p-Coumaric acid	53	
Wheat bran	<i>Neoclimastix</i> sp. crude enzyme	Ferulic acid	36	Yang et al. (2009)
		p-Coumaric acid	1	
Wheat bran	<i>Anaeromyces</i> sp. crude extract	Ferulic acid	16	Yang et al. (2009)
		p-Coumaric acid	1	
Brewer's spent grain	<i>Fusarium oxysporum</i> FAE C	Ferulic acid	40	Xiros et al. (2009)
Coffee pulp	<i>Rhizopus pusillus</i> + commercial pectinase	Chlorogenic acid	54	Torres-Mancera et al. (2011)
		Caffeic acid	7.2	
		Ferulic acid	25	
Wheat straw	<i>Xylaria polymorpha</i> glycoside hydrolase	Ferulic acid	14.5	Nghi et al. (2012)
		p-Coumaric acid	10.1	
Brewer's spent grain	<i>Lactobacillus acidophilus</i> FAE	Ferulic acid	2.1	Sewajjier et al. (2010)
		p-Coumaric acid	2.9	
		Sinapic acid	2.8	
		Caffeic acid	3.7	
Wheat arabinoxylan	<i>A. clavatus</i> FAE	Ferulic acid	200	Damásio et al. (2013)
		p-Coumaric acid	85	
Sugar cane bagasse	<i>A. clavatus</i> FAE	Ferulic acid	37	Damásio et al. (2013)
		p-Coumaric acid	7	
Wheat bran	<i>Thermobifida fusca</i> crude extract	Ferulic acid	15	Huang et al. (2013)
De starched wheat bran	<i>A. ussami</i> FAE + xylanase	Ferulic acid	35	Gong et al. (2013)
Coffee pulp	Commercial pectinase + crude extracts from <i>R. pusillus</i> , <i>A. tamaritii</i> and <i>Trametes</i> sp.	Chlorogenic acid	68.3	Torres-Mancera et al. (2013)
		Caffeic acid	38.2	

the plant cell walls allowing its easy saccharification. Specifically forage grasses like tall fescue have been used for such studies. A study by Buanafina et al. (2008) targeted the *A. niger* type A FAE (AnFaeA) under the CaMV 35 promoter, along with actin and other constitutive promoters and targeted the enzyme to the vacuole in

the plant. Interestingly, the autodigests of the plants released phenol acids with p-coumaric acid in excess over ferulic acid, even though a type A FAE was used (Buanafina et al., 2008). Similar results had been found with Italian ryegrass expressing AnFaeA (Buanafina et al., 2006).

6. Application of FAEs for the release of HCAs

There is considerable interest in the academic and industrial sectors in the search for new sources of FAEs and applications, therefore. The interest is evident through the number of patent applications and patents granted in the last 15 years (Table 3). Most of these patents are related to FAEs from microbial sources, the polypeptide sequence of the same, polynucleotides encoding the polypeptides, nucleic acid constructs, vectors, and host cells comprising the polynucleotides as well as methods of producing and using the polypeptides. Patented applications include the production of ferulic acid and other HCAs, its use as an additive in food and feed. The use of FAE as an accessory enzyme in the hydrolysis of lignocellulosic materials for the production of oligosaccharides and biofuels has been patented as well. Among the companies that have patented on FAEs include Novozymes AS and its subsidiary Novozymes Inc. On the academic side, researchers from several universities and research institutes in UK, Canada, China and France have filed patent applications on FAEs.

Enzymatic release of HCAs (Table 4) and its efficiency are directly related to the type of substrate that is employed and to an extent the type of enzyme that has been used to carry out the process. Pre-treatment of the substrate also influences the efficiency of the process, along with the parameters that are used for the release of the HCAs, like temperature, time, agitation, presence or absence of co-solvents like TWEEN and DMSO. Ferulic acid is the primary HCA that is targeted by the enzymatic treatment.

Sugar beet pulp, a waste product obtained after extracting water soluble sugars from sugar beet has been historically used as a medium for the growth of microbes possessing FAE and its induction. Sugar beet pulp/pectin contains about 6–8 mg/g ferulic acid. Bonnin et al. (2002) carried out enzymatic treatment of sugar beet pulp using *A. niger* crude extracellular fraction grown on sugar beet pulp and maltose. The treatment yielded 70% efficiency on sugar beet pulp. The reaction was carried out at 1% solid loading (solid to liquid wt/vol) and 1% enzyme loading (wt/wt), and was carried out for 24 h at 40 °C. This crude enzyme preparation was also tested on maize bran and autoclaved fraction of maize bran. Maize bran as such was recalcitrant to the enzyme, however, after autoclave pre-treatment, 95.5% of bound ferulic acid was released from the reaction mixture. FAE type B that is more active on *p*-coumaric and caffeic acid compared to ferulic and sinapic acid are expressed when fungi are grown on sugar beet pulp, however, the high activity towards release of ferulic acid in the above work may be attributed to other non-specific esterases (Crepin et al., 2004b).

Kroon et al. (2000) were able to release 98% (3.3 mg/g) of total releasable ferulic acid from wheat bran using *Penicillium funiculosum* FAE, at 1 U/g enzyme loading and 200 U/g xylanase loading, when the reaction was carried out for 24 h. *Neurospora crassa* FAE of type D was first reported by Crepin et al. (2004a), the authors followed similarity approach where the genome sequence was scanned for putative FAE sequences, followed by which the gene was cloned and expressed in *Pichia pastoris*. *Talaromyces stipitatus* a type C FAE (TsFaeC) machinery was evaluated for the efficiency of the release of ferulic acid from wheat bran and sugar beet pulp. TsFaeC alone was able to release only 1.5% and 5.8% from wheat bran and sugar beet pulp respectively, with the reaction being carried out at 37 °C, with about 3.3 U/g (substrate) and a solid substrate loading of 3% wt/vol of enzyme for 24 h. When exogenous xylanases were added, 66% efficiency was achieved for wheat bran extraction of ferulic acid (García-Conesa et al., 2004).

Sporotrichum thermophile FAE was used to release ferulic acid from de-starched wheat bran, and the maximal release was observed in 33% of total alkali releasable ferulic acid, this was

possible, with 0.4 U/g enzyme loading with 500 U/g xylanase within 1 h of reaction time (Topakas et al., 2004).

Faulds et al. (2004) conducted studies on HCAs release using commercial enzymes derived from *Humicola insolens*, Ultraflo L. With a solid loading of 1%, and 1 unit FAE equivalent of Ultraflo L, 24 h reaction with shaking (100 rpm) at 50 °C yielded 50% efficiency for *p*-coumaric acid from brewers spent grain, however, ferulic acid recovery was only about 17% for both wheat bran and brewers spent grain. The vast difference in alkali extractable ferulic acid/HCAs and enzymatically released is due to the different types of feruloyl moieties that are present in substrates. Alkaline hydrolysis will release the HCAs irrespective of the type of the bonds; however, enzymatic reactions are very specific to the types of bond and the accessibility of the macromolecular enzyme to the substrate matrix. Earlier study gave the understanding that Ultraflo L was able to release all three ferulate dimers and 65% of total releasable ferulic acid within 3 h, while the reaction was carried out at 37 °C with 50 U/g enzyme loading (Faulds et al., 2002).

Yu et al. (2004) used oat hulls as a substrate for the enzymatic release of *p*-coumaric acid, however, *Aspergillus* FAE of a commercial, feed grade was used and was unable to release sufficient amounts of *p*-coumaric acid, however, maximal release of ferulic acid at 50% was observed when the FAE was coupled with xylanase. *Fusarium proliferatum* NRRL 26517 was used to produce a type B FAE (FpFaeB), the crude enzyme when supplemented with xylanase at 345 U/ml, along with 100 U/ml of endogenous xylanase, released 32% of ferulic acid from corn bran. The enzyme loading was 5 U/g of FpFaeB and solid loading of 2%. The reaction was carried out at 45 °C for 24 h with shaking at 200 rpm (Shin and Chen, 2006). The same group isolated a fungus *Neosartorya spinosa*, the extracellular enzyme component from the organism could lead to complete recovery of alkali releasable ferulic acid from corn bran, when the solid loading was 2% and the enzyme loading was 10 U/g FAE and 23 U/g xylanase activity, with the reaction held at 45 °C for 24 h. The enzyme not only released the total ferulic acid, but also 97.3% of reducing sugars were released (Shin et al., 2006).

Benoit et al. (2006) used type A (AnFaeA) and type B (AnFaeB) *A. niger* FAE and studied the release of HCAs from coffee pulp, apple marc, corn bran and sugar beet pulp. AnFaeB performed better compared to AnFaeA. AnFaeB could release 100% of caffeic acid, 73% of *p*-coumaric acid (0.08 mg/g released) from coffee pulp and 40% of ferulic acid 83% caffeic acid and 34% *p*-coumaric acid from apple marc. A significant release of 58% ferulic acid from steam exploded wheat straw was observed while only 16% of *p*-coumaric acid was released 40% of ferulic acid from maize bran was released (AnFaeA gave maximal activity) and 25% of *p*-coumaric acid from the same substrate. Sugar beet pulp was almost recalcitrant, with only 8% of the total releasable ferulic acid being released by AnFaeB.

Hegde et al. (2006) did a study using *A. niger* CFR 1105, where instead of the released phenolic acid, the content of bound phenolic acids was characterised. De starched wheat bran and rice bran was used as substrate for fermentation by the 4th day; 86% of ferulic acid from wheat bran and 78% of ferulic acid from rice bran was reduced. The study was focused on the degradation of cereal brans; hence the fate of the released HCAs was unknown.

Ferreira et al. (2007) published a study with *Streptomyces tendae* being able to release maximum of 10% of total releasable ferulic acid from sugar beet pulp using a 3 days old culture supernatant from the organism grown on sugar beet pulp. *Neocalimastix* sp. and *Anaeromyces* sp. FAE crude preparation were tested for release of ferulic acid from Chinese wild ryegrass, wheat bran, maize bran, cornstarch, wheat straw, however, the enzyme mixtures of *Neocalimastix* and *Anaeromyces* were able to release significant amounts of about 69% and 53% *p*-coumaric acid respectively from maize bran. While the only significant amount of release that was

observed was that of 36% ferulic acid from wheat bran using the *Neocalimastix* enzyme mixture (Yang et al., 2009).

While studying *Fusarium oxysporum* FAE type C (FoFaeC) it was found that with 0.32 U/g of FoFaeC and 400 U/g xylanase, and solid loading of 7.5%, the reaction gave 40% of total releasable ferulic acid from brewer's spent grain within 3 h, when the reaction was carried out at 50 °C with 15,000 rpm (Xiros et al., 2009).

Work focussing on coffee pulp was neglected after 2006 as far as enzymatic extraction was concerned till Torres-Mancera et al. (2011), published work on the release of HCAs from coffee pulp, using enzymes produced by *Rhizopus pusillus* using two different inducers (coffee pulp and olive oil) and using commercial pectinases. The work resulted in the release of a maximum of 54% of total releasable chlorogenic acid from the coffee pulp, amounting to 1.29 mg/g of chlorogenic acid yield. Maximal caffeic acid was released using the same combination, as 7.2% of releasable caffeic acid, corresponding to 0.04 mg/g and 25% of ferulic acid corresponding to 0.02 mg/g (Torres-Mancera et al., 2011).

Xylaria polymorpha expressed an enzyme with rhamnosidase activity coupled with FAE activity and the enzyme could release 14.5% of ferulic acid and 10.1% of *p*-coumaric acid from native wheat straw within 2 h, incubated at 37% with a solid loading of 1% and enzyme at 0.05 μM (Nghy et al., 2012).

Earlier FAE from *Lactobacillus acidophilus* K1 was used in the pure form to release HCAs from brewers spent grain, which resulted in the release of ferulic, *p*-coumaric, caffeic acid in the range of 2–6% of the total alkali releasable amounts (Szwajgier et al., 2010).

Recent studies on *Aspergillus clavatus* FAE indicated that the enzyme was capable of releasing 85% of *p*-coumaric acid (~2.5 mg/g) from wheat arabinoxylan within 15 h at 30 °C, while it could release twice the amount of ferulic acid from wheat arabinoxylan (4 mg/g) compared to mild alkali treated wheat arabinoxylan. The enzymatic extract was not as active on sugar cane bagasse, releasing on 0.5 mg/g of each ferulic acid and *p*-coumaric acid, accounting for 37% and 7% efficiency respectively (Damásio et al., 2013).

Huang et al. (2013) were able to release 15% of total releasable ferulic acid from wheat bran using *Thermobifida fusca* a thermophilic actinomycete from the fermentation medium. *Aspergillus usami* FAE was studied for the release of ferulic acid from de starched wheat bran and the study resulted in the release of 35% maximal release, in the presence of 56 U of the recombinant FAE and about 300 units of recombinant xylanase from the same organism after 10 h of incubation at 40 °C (Gong et al., 2013).

A study on the growth of koji mould *Rhizopus oryzae* on the rice bran showed that the content of ferulic acid in the bran when unfermented was about 33 mg/g, while after fermentation for 120 h (in solid-state), the bran content of ferulic acid was increased to 765 mg/g, indicating an enrichment of ferulic acid, due to degradation of the rest of the components in rice bran (Schmidt et al., 2014).

The most recent study on extraction of chlorogenic acid and caffeic acid from the coffee pulp gave maximal efficiency of 68% release of chlorogenic acid (1.6 mg/g) and 38% efficiency for caffeic acid (0.715 mg/g) using a combination of four enzymes from the following sources, commercial pectinase, *R. pusillus*, *A. tamarii* and *Trametes* sp. at 4 U/g enzyme loading and 10% solid loading (Torres-Mancera et al., 2013).

7. Recovery of HCAs

There is less information about large-scale purification of HCAs. However, there are reports of the use of methods like solvent extraction and the use of different kinds of resins and even

powdered activated charcoal. Solvent extraction process requires the use of ethyl acetate for extraction of the dissolved ferulic acid. The technique involves extracting the solution containing HCAs to be extracted twice or more with equal volumes of ethyl acetate. The ethyl acetate fractions are pooled together and concentrated using reduced vacuum. When there are other water soluble impurities are co-purified with ferulic acid, the ethyl acetate is washed with cold water (Di Gioia et al., 2009).

Other methods for extraction involve the use of aqueous ethanol. Buranov and Mazza (2009) used 30% ethanol for the recovery of ferulic acid. The method suggested diluting the hydrolysate three-fold with 95% ethanol, followed by precipitation of sugars and other impurities using absolute anhydrous ethanol. The mixture is then centrifuged, and the 30% aqueous ethanol is then evaporated to obtain ferulic acid.

Methods that utilize resins for adsorption of HCAs have been reported. Most studies are involved with the use of resins other than ion exchanges. The use of Styrene-divinylbenzene copolymer utilized hydrophobic interactions through the phenol ring of the hydroxycinnamic acid moiety while PVPP resins bind HCAs by hydrogen bonds. Couteau and Mathaly (1997) studied the efficiency of various resins for purification of ferulic acid. XAD-16 and XAD-1180 displayed high binding capabilities compared to XAD-2 and XAD-4. PVPP was found to be more specific to ferulic acid adsorption than XAD-2, XAD-4. PVPP was found to have lower equilibrium times for HCAs compared to XAD resins. PVPP had a lower equilibrium time for caffeic acid compared to bulkier compounds like ferulic acid. All the resins performed better at acidic pH, due to the protonation of the carboxylic acid. PVPP has lower absorption capacity compared to XAD-16 resin; however, higher selectivity is displayed by PVPP and hence greater purity in case of PVPP. The last method includes the use of activated charcoal for the adsorption of ferulic acids. Steam activated and chemically activated powdered and granular carbon was tested for the adsorption of ferulic acid. Chemically activated powdered carbon seems to be the best in adsorption capacity, however, the equilibration time for it is higher than PVPP. While activated charcoal adsorbs 50% more ferulic acid compared to PVPP, it also adsorbs non-specific compounds. Therefore, activated charcoal adsorbed with the HCAs is washed with hot water (90 °C) and with dilute acetic acid to remove other impurities. The final elution is carried out in 0.5 M NaOH (Ou et al., 2007), further purification if required used macroporous anion exchangers. The highest grade of purity for ferulic acid, however, may be attained through techniques like HPLC. For applications involving biotransformation of ferulic acid, it is better to purify the final product, instead of purifying ferulic acid first, followed by refining the product.

Tilay et al. (2008) purified ferulic acid from an alkaline hydrolyzate of maize bran by column chromatography followed by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC). The alkaline hydrolyzate was extracted three times with ethyl acetate and the organic fraction was evaporated under reduced pressure. The concentrated extract was loaded onto chromatographic column filled with Amberlite XAD-16 and eluted with ethanolic ammonium hydroxide (0.1%). Fractions with higher content of ferulic acid were and subjected to thin layer chromatography on silica plates. HPTLC was carried out using a mobile phase of benzene/dioxane/acetic acid (85:15:1). Column chromatography yielded a 50.89% pure ferulic acid with 57.97% recovery, after HPTLC purity of the ferulic acid increased up to 95.35%.

Liu et al. (2006) developed a method for the purification of ferulic acid from extracts of *Radix Angelicae sinensis* using preparative high-speed counter-current chromatography (HSCCC). They obtained ferulic acid with over 98% purity employing a solvent system consisted of *n*-hexane-ethyl acetate-methanol-water (3:7:5:5, v/v).

8. Future perspective

New reports of feruloyl esterase producing microorganisms are being published and research towards the same continues. However, studies related to performance of feruloyl esterase along with enzymes other than xylanase for lignocellulosic hydrolysis remain yet to be explored. The correct combination of pretreatment strategies, along with optimized enzyme cocktail along with proper process flow designs would serve the goal of sustainable energy. With efficient and exhaustive research focused towards, sustainable energy, work on feruloyl esterase will play a small but significant part in the equation, which is yet to be unravelled. With developments in molecular cloning and genetic manipulations, performance of the enzyme can be tuned to fit the role that it is required to play. There is a gap in research regarding the improvement in enzyme activity using tools like site directed mutagenesis and directed evolution which may be addressed by upcoming researchers. HCAs like ferulic acid could be one of the pivotal value added platform chemicals which can be generated in association with lignocellulosic biofuel industry. Even though FAEs has been a subject of research for as long as three decades, excavating further, understanding the biochemistry and exploring the diversity of this group of enzymes will certainly open up new avenues for applications of this enzyme.

9. Conclusion

The above studies highlight the use of FAEs as versatile enzymes able to act on different plant-based materials and valorise these otherwise problematic by-products. The enzymatic treatments may also contribute to lowering the cost of fuel ethanol, along with a host of other valorisation options, thus providing to the bio-refining of these agro by-products. Even though many by-products as showed here have been exploited for the release of HCAs, there are a lot of underutilized by-products like brewers spent grain, sugarcane bagasse, rice bran, jojoba meal, etc. that have significant potential which need to be exploited.

Acknowledgements

The author NG thanks UGC-New Delhi for providing financial aids through fellowship, and the corresponding author thanks DST-CONACYT for providing financial aid, under the Indo-Mexican project for bilateral exchange to work on value added chemicals from agro residual biomass.

References

- Abolito, K., Wu, M., Bergeron, H., Grosse, S., Lau, P.K., 2010. Thermostable feruloyl esterase for the bioproduction of ferulic acid from triticale bran. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 195–203.
- Asther, M., Haon, M., Roussos, S., Record, E., Delaitre, 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 Biochem.* 38, 685–691.
- Benoit, L., Danchin, E.J., Bleichrodt, R.-J., de Vries, R., 2008. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnol. Lett.* 30, 387–396.
- Benoit, L., Navarro, D., Marret, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigollet, J.C., Asther, M., Asther, M., 2006. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr. Res.* 341, 1820–1827.
- Blom, D.L., Kataeva, L.A., Li, X.-L., Ljungdahl, L.G., 2000. Feruloyl esterase activity of the *Clostridium thermocellum* cellulosome can be attributed to previously unknown domains of XynY and XynZ. *J. Bacteriol.* 182, 1346–1351.
- Bonnin, E., Saulnier, L., Brunel, M., Marot, C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Thibault, J.-F., 2002. Release of ferulic acid from agroindustrial by-products by the cell wall-degrading enzymes produced by *Aspergillus niger* I-1472. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 1000–1005.
- Bonrina, E., Brunel, M., Gouy, Y., Lesage-Meessen, L., Asther, M., Thibault, J.F., 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 Microb. Technol.* 28, 70–80.
- Borneman, W.S., Hartley, R.D., Morrison, W.H., Akon, D.E., Ljungdahl, L.G., 1990. Feruloyl and p-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33, 345–351.
- Borneman, W.S., Ljungdahl, L.G., Hartley, R.D., Akon, D.E., 1992. Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Noxcallmesrix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3762–3766.
- Buanafina, M.M.D.O., 2009. Feruloylation in grasses: current and future perspectives. *Mol. Plant* 2, 861–872.
- Buanafina, M.M.D.O., Langdon, T., Hauck, B., Dalton, S., Morris, P., 2008. Expression of a fungal ferulic acid esterase increases cell wall digestibility of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Plant Biotechnol. J.* 6, 264–280.
- Buanafina, M.M.D.O., Langdon, T., Hauck, B., Dalton, S.J., Morris, P., 2006. Manipulating the phenolic acid content and digestibility of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) by vacuolar-targeted expression of a fungal ferulic acid esterase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130, 416–426.
- Buranov, A.U., Mazza, G., 2009. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurized solvents. *Food Chem.* 115, 1542–1548.
- Couteau, D., Mathaly, P., 1997. Purification of ferulic acid by adsorption after enzymic release from a sugar-beet pulp extract. *Ind. Crop. Prod.* 6, 237–252.
- Couteau, D., McCaritzey, A.L., Gibson, G.R., Williamson, G., Faulds, C.B., 2001. Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J. Appl. Microbiol.* 90, 873–881.
- Crepin, V.F., Conneron, I.F., Faulds, C.B., 2004a. Identification of a type-D feruloyl esterase from *Neurospora crassa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 567–570.
- Crepin, V.F., Faulds, C.B., Conneron, I.F., 2004b. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647–652.
- Damasio, A.R.L., Braga, C.M.P., Brenelli, L.B., Citadini, A.P., Mandelli, F., Coia, J., De Almeida, R.F., Salvador, V.H., Paixao, D.A.A., Segato, F., Mercadante, A.Z., De Oliveira Neto, M., Do Santos, W.D., Squina, F.M., 2013. Biomass-to-bio-products application of feruloyl esterase from *Aspergillus clavatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 6759–6767.
- Di Gioia, D., Sciubba, L., Ruzzi, M., Setti, L., Fava, F., 2009. Production of vanillin from wheat bran hydrolyzates via microbial bioconversion. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 1441–1448.
- Donaghy, J., Bronnenmeier, K., Soto-Kelly, P., McKay, A., 2000. Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercoarum*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 458–466.
- Faulds, C.B., Mandalari, G., Lo Curto, R.B., Bisignano, G., Christakopoulos, P., Waldron, K.W., 2006. Synergy between xylanases from glycoside hydrolase family 10 and family 11 and a feruloyl esterase in the release of phenolic acids from cereal arabinoxylan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 622–629.
- Faulds, C.B., Mandalari, G., LoCurto, R., Bisignano, G., Waldron, K.W., 2004. Arabinoxylan and mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 644–650.
- Faulds, C.B., Sancho, A.I., Barcelomé, B., 2002. Mono- and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 489–493.
- Faulds, C.B., Williamson, G., 1994. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. *Microbiology* 140, 779–787.
- Ferreira, P., Diez, N., Faulds, C.B., Soliveri, J., Copa-Patiño, J.L., 2007. Release of ferulic acid and feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp by *Streptomyces tendae*. *Bioresour. Technol.* 98, 1522–1528.
- Fillingham, I.J., Kroon, P.A., Williamson, G., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., 1999. A modular cinnamoyl ester hydrolase from the anaerobic fungus *Phromyces equi* acts synergistically with xylanase and is part of a multiprotein cellulose-binding cellulase-hemicellulase complex. *Biochem. J.* 343, 215–224.
- García-Conesa, M.T., Crepin, V.F., Goldson, A.J., Williamson, G., Cummings, N.J., Conneron, I.F., Faulds, C.B., Kroon, P.A., 2004. The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: Production of three discrete feruloyl esterases, including a novel enzyme, TsfacC, with a broad substrate specificity. *J. Biotechnol.* 108, 227–241.
- Gong, Y.Y., Yin, X., Zhang, H.M., Wu, M.C., Tang, C.D., Wang, J.Q., Fang, Q.F., 2013. Cloning, expression of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* E001 and its applicability in generating ferulic acid from wheat bran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40, 1433–1441.
- Harholt, J., Bach, I.C., Lind-Bouquin, S., Nurn, K.J., Madrid, S.M., Birch-Pedersen, H., Holm, P.B., Scheller, H.V., 2010. Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) accumulating heterologous endo-xylanase or ferulic acid esterase in the endosperm. *Plant Biotechnol. J.* 8, 351–362.
- Hatfield, R.D., Ralph, J., Grabber, J.H., 1999. Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.* 79, 403–407.
- Hegde, S., Kavitha, S., Varadaraj, M.C., Muralikrishna, G., 2006. Degradation of cereal bran polysaccharide-phenolic acid complexes by *Aspergillus niger* CFR 1105. *Food Chem.* 96, 14–19.
- Hegde, S., Muralikrishna, G., 2009. Isolation and partial characterization of alkaline feruloyl esterases from *Aspergillus niger* CFR 1105 grown on wheat bran. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 1963–1969.
- Huang, Y.-C., Chen, C.-Y., Chen, W.-L., Ciou, Y.-P., Yang, T.-Y., Yang, C.-H., 2013. Production and antioxidant properties of the ferulic acid-rich detached wheat

- bran hydrolysate by feruloyl esterases from thermophilic actinomycetes. *BioResources* 8, 4981–4991.
- Kroon, P.A., Williamson, G., 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 79, 355–361.
- Kroon, P.A., Williamson, G., Fish, N.M., Archer, D.B., Belshaw, N.J., 2000. A modular esterase from *Penicillium funiculosum* which releases ferulic acid from plant cell walls and binds crystalline cellulose contains a carbohydrate binding module. *Eur. J. Biochem.* 267, 6740–6752.
- Kumar, C.G., Kamle, A., Kamal, A., 2013. Purification and biochemical characterization of feruloyl esterases from *Aspergillus terreus* MITCC 11096. *Biotechnol. Prog.* 29, 924–932.
- Laszlo, J.A., Compton, D.L., Li, X.L., 2006. Feruloyl esterase hydrolysis and recovery of ferulic acid from jojoba meal. *Ind. Crop. Prod.* 23, 46–53.
- Levasseur, A., Beroit, I., Asther, M., Asther, M., Record, E., 2004. Homologous expression of the feruloyl esterase B gene from *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr. Purif.* 37, 126–133.
- Levasseur, A., Saloheimo, M., Navarro, D., Andberg, M., Monot, F., Nakari-Setälä, T., Asther, M., Record, E., 2006. Production of a chimeric enzyme tool associating the *Trichoderma reesei* swollenin with the *Aspergillus niger* feruloyl esterase A for release of ferulic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 872–880.
- Liu, Z., Wang, J., Shen, P., Wang, C., Shen, Y., 2006. Microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of ferulic acid from *Rodiox Angélica sinensis*. *Sep. Purif. Technol.* 52, 18–21.
- Manach, C., Scalbert, A., Moranod, C., Remésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 727–747.
- Mathew, S., Abraham, T.E., 2004. Ferulic acid: an antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24, 59–83.
- Mezón, V., Rao, M., 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Prog. Energy Combust. Sci.* 38, 522–550.
- Min, J.Y., Kang, S.M., Park, D.J., Kim, Y.D., Jung, H.N., Yang, J.K., Seo, W.T., Kim, S.W., Karigar, C.S., Choi, M.S., 2006. Enzymatic release of ferulic acid from *Ipomoea batatas* L. (sweet potato) stem. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 11, 372–376.
- Mukherjee, G., Singh, R.K., Mitra, A., Sen, S.K., 2007. Ferulic acid esterase production by *Streptomyces* sp. *Bioresour. Technol.* 98, 211–213.
- Nghi, D.H., Bittner, B., Kellner, N., Jehmlich, N., Ullrich, R., Pecyna, M.J., Nussliainen, P., Sipilä, J., Hoang, L.M., Hofrichter, M., Liers, C., 2012. The wood rot ascomycete *Xylaria polymorpha* produces a novel GH78 glycoside hydrolase that exhibits α -*rhamnosidase* and feruloyl esterase activities and releases hydroxycinnamic acids from lignocelluloses. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4893–4901.
- Olivares-Hernández, R., Sunner, H., Frisvad, J.C., Olsson, L., Nielsen, J., Panagiotou, G., 2010. Combining substrate specificity analysis with support vector classifiers reveals feruloyl esterase as a phylogenetically informative protein group. *PLoS ONE* 5, e12781.
- Ou, S., Luo, Y., Xue, F., Huang, C., Zhang, N., Liu, Z., 2007. Separation and purification of ferulic acid in alkaline-hydrolysis from sugarcane bagasse by activated charcoal adsorption/ion exchange resin exchange chromatography. *J. Food Eng.* 78, 1298–1304.
- Qi, M., Wang, P., Selinger, L.B., Yanke, L.J., Forster, R.J., McAllister, T.A., 2011. Isolation and characterization of a ferulic acid esterase (FaeIA) from the rumen fungus *Anaeromyces mucronatus*. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1341–1350.
- Razaghi-Asl, N., Garido, J., Khazraei, H., Borges, F., Firuzi, O., 2013. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure–activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 20, 4436–4450.
- Record, E., Asther, M., Sigouillot, C., Pagès, S., Punt, P.J., Delattre, M., Haon, M., van den Hordel, C.A.M.J.J., Sigouillot, J.C., Lesage-Meessen, L., Asther, M., 2003. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62, 349–355.
- Russo, A., Longo, K., Vanella, A., 2002. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73, S21–S29.
- Schmidt, C.G., Gonçalves, L.M., Prietto, L., Hackbart, H.S., Furlong, E.B., 2014. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chem.* 146, 321–327.
- Shahidi, F., Chandrasekara, A., 2010. Hydroxycinnamates and their in vitro and in vivo antioxidant activities. *Phytochem. Rev.* 9, 147–170.
- Shin, H.D., Chen, R.R., 2006. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 478–485.
- Shin, H.D., McClendon, S., Le, T., Taylor, F., Chen, R.R., 2006. A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL185. *Biotechnol. Bioeng.* 95, 1108–1115.
- Szwajgier, D., Wałko, A., Targoński, Z., Niedźwiadek, M., Bancarzewska, M., 2010. The use of a novel ferulic acid esterase from *Lactobacillus acidophilus* K1 for the release of phenolic acids from brewer's spent grain. *J. Inst. Brew.* 116, 293–303.
- Tilay, A., Bule, M., Kishenkumar, J., Annappure, U., 2008. Preparation of ferulic acid from agricultural wastes: its improved extraction and purification. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7644–7648.
- Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., Christakopoulos, P., 2004. Purification and characterization of a type B feruloyl esterase (StFAE-A) from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophilum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 686–690.
- Topakas, E., Vafadi, C., Christakopoulos, P., 2007. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases. *Process Biochem.* 42, 497–509.
- Torres-Mancera, M.T., Baqueiro-Peña, I., Figueroa-Montero, A., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G., 2013. Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnol. Prog.* 29, 337–345.
- Torres-Mancera, M.T., Cordova-López, J., Rodríguez-Serrano, G., Roussos, S., Ramirez-Coronel, M.A., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G., 2011. Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technol. Biotechnol.* 49, 369–373.
- Udatha, D.B.R.K.G., Kouskoumvekaki, I., Olsson, L., Panagiotou, G., 2011. The interplay of descriptor-based computational analysis with pharmacophore modeling builds the basis for a novel classification scheme for feruloyl esterases. *Biotechnol. Adv.* 29, 94–110.
- Wong, D.W.S., Chan, V.J., Bart, S.B., Sarath, G., Liao, H., 2011. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to produce feruloyl esterase for the release of ferulic acid from switchgrass. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1961–1967.
- Wu, M., Abokitso, K., Grosse, S., Leisch, H., Lau, P.C.K., 2012. New feruloyl esterases to access phenolic acids from grass biomass. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 129–143.
- Xie, C.Y., Gu, Z.X., You, X., Liu, G., Tan, Y., Zhang, H., 2010. Screening of edible mushrooms for release of ferulic acid from wheat bran by fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 46, 125–128.
- Xiros, C., Moukoulis, M., Topakas, E., Christakopoulos, P., 2009. Factors affecting ferulic acid release from Brewer's spent grain by *Fusarium oxysporum* enzymatic system. *Bioresour. Technol.* 100, 5917–5921.
- Xu, F., Sun, R.C., Sun, J.X., Liu, C.F., He, B.H., Fan, J.S., 2005. Determination of cell wall ferulic and *p*-coumaric acids in sugarcane bagasse. *Anal. Chim. Acta* 552, 207–217.
- Yang, H.J., Yue, Q., Cao, Y.C., Zhang, D.F., Wang, J.Q., 2009. Effects of crude feruloyl and acetyl esterase solutions of *Neocallimastix* sp. YQ1 and *Anaeromyces* sp. YQ3 isolated from Holstein steers on hydrolysis of Chinese wildrye grass hay, wheat bran, maize bran, wheat straw and corn stalks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154, 218–227.
- Yu, P., McKinnon, J.J., Maenz, D.D., Racz, V.J., Christensen, D.A., 2004. The specificity and the ability of *Aspergillus* feruloyl esterase to release *p*-coumaric acid from complex cell walls of oat hulls. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 79, 729–733.