

---

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



**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**OBTENCIÓN DE ÁCIDO CLOROGÉNICO DE LA PULPA DE CAFÉ A PARTIR DE  
EXTRACTOS ENZIMÁTICOS PRODUCIDOS POR FERMENTACIÓN EN MEDIO  
SÓLIDO**

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

**PRESENTA**

**MARÍA TERESA TORRES MANCERA**  
**MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA**

Director

Dr. J. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

Asesores UAMI-México

Dra. Ma. ASCENCIÓN RAMÍREZ CORONEL

Dr. ERNESTO FAVELA TORRES

Asesores IRD-Francia

Dra. ISABELLE PERRAUD GAIME

Dr. SEVASTIANOS ROUSSOS

**MARZO 2013**

---

---

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

---

---

México D.F. a 13 de Marzo de 2013.

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

**EXTRACCION ENZIMATICA DE ÁCIDO CLOROGÉNICO A PARTIR DE PULPA  
DE CAFÉ**

que presentó  
***María Teresa Torres Mancera***

Director	Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda
Asesores México UAM-Iztapalapa	Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel Dr. Ernesto Favela Torres
Asesores Francia IRD Université Aix Marseille	Dra. Isabel Perraud Gaime Dr. Sevastianos Roussos

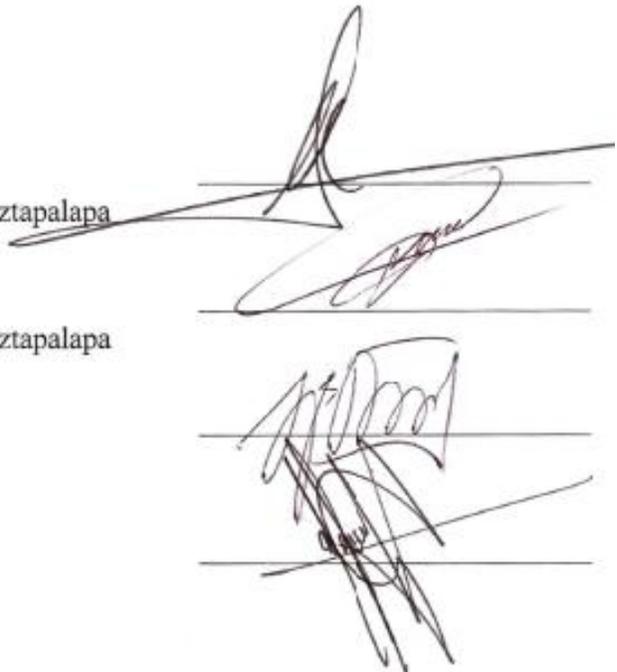
**JURADO**

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Secretario: Dr. Alberto Castillo Morales  
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Vocal: Dr. Sevastianos Roussos  
Université Aix Marseille

Vocal: Dr. Cristóbal Noé Aguilar González  
Universidad Autónoma de Coahuila



---

*Agradecimientos y dedicatorias a:*

Ma. Teresa Mancera y Manuel Torres por su apoyo y comprensión

Arturo A. Figueroa Montero por su amistad, apoyo, paciencia y solidaridad durante toda esta etapa de mi vida

Gloria Trejo, Emilio Figueroa T. Julia Figueroa T. y Leonardo León F. por su amistad, apoyo y momentos inolvidables

David J. Torres y Víctor M. Torres por su apoyo

Gerardo Saucedo C. por su amistad, guía, apoyo y críticas

Ernesto Favela T. por su amistad, apoyo, sugerencias y críticas

Isabelle Perraud G. y Sevastianos Roussos por su amistad, paciencia y sugerencias

Ascensión Ramírez C. por sus observaciones y sugerencias

Sr. Uriel y Sr. Quique por compartir su gran visión de la vida

Todos los doctores, amigos y compañeros de la UAM-I, a todos los integrantes de la PP4 y a todos los integrantes del IRD-Francia por dejarme conocerlos y convivir con ustedes

En especial a todos los que compartieron mucho de su tiempo conmigo  
Rafael A., Marco V., Luz T., Toño M., Iray M., Rosa Isela G., Nayeli A., Susana V., Itzamna B., Patricia R.

Dedicada a quienes con su cariño me han demostrado su aprecio

---

## RESUMEN

México es un importante productor a nivel mundial de café. Los residuos como la pulpa de café, pueden ser tratados mediante procesos biotecnológicos, para evitar problemas ambientales y obtener compuestos de alto valor agregado, contribuyendo a mejorar la situación socio-económicos de este sector agroindustrial.

En esta tesis se estudió la extracción del ácido clorogénico esterificado a la pared celular de la pulpa de café mediante extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido (FMS). Los resultados están organizados en cuatro bloques: a) Desarrollo de metodología (enzimática y de respirometría), b) Pre-selección y selección de cepas, c) Estudio del efecto de las enzimas despolimerizantes sobre la obtención del ácido clorogénico y d) Optimización de la producción de extractos enzimáticos para la obtención del ácido clorogénico.

Se desarrollaron y evaluaron diversas técnicas analíticas para la cuantificación de la actividad pectinasa, xilanasa y celulasa en cajas de Petri y la cuantificación de la actividad clorogenato esterasa por espectrofotometría. Se desarrolló un sistema para la medición en línea del CO<sub>2</sub> (%) producido, O<sub>2</sub> (%) consumido y el flujo (ml/min) durante la FMS. El sistema permitió obtener datos confiables y reproducibles. El sistema desarrollado esta en proceso de registro para patente.

Se estudiaron 6 cepas de hongos filamentosos *A. niger* (A10 y CH4), *A. tamarii*, *R. pusillus*, *Trametes* sp. y *Trichoderma harzianum*. Los extractos enzimáticos producidos por FMS de *R. pusillus* y *Trametes* sp. presentaron la mayor capacidad para extraer el ácido clorogénico (17%) y la menor capacidad para hidrolizar el ácido clorogénico del medio. La mezcla de los extractos crudos producidos por estas dos cepas con la pectinasa comercial extrajeron el 68% del ácido clorogénico. Se determinó que la presencia de enzimas despolimerizantes, era necesaria para realizar la extracción del ácido clorogénico.

Con una metodología de diseño de mezclas se determinó que la presencia de las actividades pectinolítica (APec) y xilanolítica (AXil) tiene un efecto importante en la extracción del ácido clorogénico. Los intervalos donde se presentó la zona de máxima extracción de ácido clorogénico esterificado fue (U/g PC):  $60 \leq AXil \leq 150$ ,  $50 \leq APec \leq 140$ ,  $0 \leq ACel \leq 40$ . El

---

rendimiento obtenido por las enzimas comerciales pectinasa y xilanasas (69%) fue similar al obtenido con la mezcla de los extractos crudos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. producidos por FMS adicionando la pectinasa comercial (68%).

Se optimizaron las condiciones de cultivo para producir las enzimas despolimerizantes por FMS de *R. pusillus*, utilizando diseños experimentales. Con el diseño experimental tipo Plackett-Burman se identificó que la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y la temperatura tienen un efecto positivo sobre la producción de APec y AXil. Mientras que la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  tienen un efecto negativo sobre la enzima clorogenato esterasa (CIE) responsable de hidrolizar el ácido clorogénico a ácido cafeico y ácido quínico. Los perfiles de actividad enzimática de la pectinasa, xilanasas y CIE mostraron que la mayor actividad de la CIE se presentó 4 horas después de presentarse la mayor APec y AXil. A través de un diseño factorial central compuesto se determinó que los intervalos donde se presentó la zona de mayor APec y AXil fueron (g/100 g SS):  $5 \leq \text{Sacarosa} \leq 6$ ,  $2 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 3.3$  y  $2.1 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 2.9$  y la menor actividad de la CIE fueron (g/100 g SS):  $5.4 \leq \text{Sacarosa} \leq 7.5$ ,  $2.5 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 4$ ,  $2.5 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 4$ .

Se observó un posible efecto de represión catabólica a concentraciones mayores de sacarosa de 6 g/100 g sobre las actividades pectinolítica y xilanolítica. Mientras que la actividad de la clorogenato esterasa disminuyó conforme aumentaba el nivel de sacarosa en el medio de cultivo.

Por último se evaluó la extracción del ácido clorogénico con el extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido por FMS con las condiciones optimizadas de cultivo (g/100 g SS): sacarosa, 5.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.8 y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.6. El rendimiento de extracción del ácido clorogénico con el extracto crudo de *R. pusillus* fue del 69%. Este rendimiento fue similar al obtenido con las dos enzimas comerciales pectinasa y xilanasas y a la mezcla de la pectinasa comercial con los extractos crudos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. producidos por FMS.

La evidencia experimental presentada en este trabajo mostró el potencial de extraer compuestos de alto valor agregado como el ácido clorogénico esterificado a la pared celular de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos crudos producidos por FMS.

**ABSTRACT**

Mexico is an important coffee producer in the world. The wastes as coffee pulp can be treated by biotechnological processes to avoid environmental problems and to obtain high added value compounds, contributing to improve the socio-economic situation of this agroindustrial sector.

In this work was studied the extraction of chlorogenic acid esterified to cell wall coffee pulp by enzyme extracts produced by solid-state fermentation (SSF). The results are organized on four sections: a) Development of methodology (enzymatic and respirometry), b) Pre-selection and selection of strains, c) Study of the effect of depolymerizing enzymes on obtaining of chlorogenic acid and d) Optimization of production of enzyme extracts to obtained chlorogenic acid.

We developed and evaluated different analytical techniques for quantifying of pectinase, xylanase and cellulase activities in Petri dishes and the quantification of chlorogenate esterase activity by spectrophotometry. We developed a system for online measurement of CO<sub>2</sub> (%) produced, O<sub>2</sub> (%) consumed and flow (ml / min) during SSF. This system allows obtaining good quality and reproducible data. System developed is in procces for patent registration.

Six strains from filamentous fungal were used including *A. niger* (A10 and CH4), *A. tamarii*, *R. pusillus*, *Trametes* sp. and *Trichoderma harzianum*. The enzymatic extracts by *R. pusillus* and *Trametes* sp produced by SSF were able to extract the highest concentration of chlorogenic acid (17%) and able to hydrolyze the lowest concentration of chlorogenic acid. The mixtures of crude extracts produced by these two strains added with commercial pectinase extracted 68% of chlorogenic acid. It was determined that the presence of depolymerizing enzymes (pectinase), are necessary for extraction of chlorogenic acid.

With a mixture design methodology it was determined that the presence of pectinolytic (APec) and xylanolytic (AXil) activities have an important effect on the extraction of chlorogenic acid. The intervals in where it was presented the zone of higher extraction of chlorogenic acid esterified for the 3 enzymatic activities were (U / g PC):  $60 \leq AXil \leq 150$ ,  $50 \leq APec \leq 140$ ,  $0 \leq ACel \leq 40$ . The yield obtained by commercial pectinase and xylanase (69%) was similar to that

obtained with the mixture of the crude extracts by *R. pusillus* and *Trametes* sp. produced by SSF with commercial pectinase (68%).

The culture conditions for production by SSF the depolymerizing enzymes by *R. pusillus* were optimized with experimental design. Experimental design type Plackett-Burman, allow to identify that the concentration of sucrose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  and temperature have a positive effect on the APec and AXil. While, the concentration of sucrose,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  have a negative effect on the production of chlorogenate esterase (CIE), this enzyme hydrolyzed the chlorogenic acid to caffeic and quinic acids. The enzymatic activity profiles of pectinase, xylanase and CIE showed that the higher CIE activity was presented four hours after that the higher APec and AXil. Central composite factorial design allow to identify that the intervals where appears the zone of higher APec and AXil were (g/100 g SS):  $5 \leq \text{Sucrose} \leq 6$ ,  $2 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 3.3$  and  $2.1 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 2.9$  and the intervals where presented the zone of lower CIE activity were (g/100 g SS):  $5.4 \leq \text{Sucrose} \leq 7.5$ ,  $2.5 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 4$ ,  $2.5 \leq ((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 4$ .

It was observed a possible effect of catabolism repression on pectinolytic and xylanolytic activities in the assays that showed the highest concentration of sucrose 6 g/100 g. While, by other side, chlorogenate esterase activity decreased in the assays that showed the highest concentration of sucrose in the culture medium.

Finally, it was evaluated the extraction of chlorogenic acid by crude enzymatic extract by *R. pusillus* produced by SSF. The culture conditions were as follows (g/100 g SS): sucrose, 5.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.8 and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.6. The extraction yield of chlorogenic acid with this extract was 69%. This extraction yield was similar to that obtained with the preparation of two commercial pectinase and xylanase and the mixture of the crude enzymatic extracts by *R. pusillus* and *Trametes* sp. produced by SSF with a commercial pectinase.

Experimental evidence presented in this work showed the potential of extracting high-value compounds such as esterified chlorogenic acid to the cell wall of coffee pulp by crude enzymatic extracts produced by SSF.

---

**ÍNDICE DEL CONTENIDO**

1	Introducción	1
2	Revisión bibliográfica	4
2.1	El café y sus subproductos	5
2.1.1	El café	5
2.1.2	Pulpa de café	8
2.1.3	Otros subproductos	11
2.2	Pared celular	13
2.2.1	Celulosa	13
2.2.2	Hemicelulosa	14
2.2.3	Pectina	14
2.2.4	El ácido clorogénico en la pared celular	15
2.3	Compuestos fenólicos	16
2.3.1	Ácidos hidroxicinámicos	16
2.3.2	Ácido clorogénico	21
2.3.2.1	Fuentes de ácido clorogénico	23
2.3.2.2	Usos y comercialización	24
2.4	Métodos de extracción del ácido clorogénico	26
2.4.1	Métodos químicos	26
2.4.2	Métodos biológicos	27
2.5	Biotransformación y transformación del ácido clorogénico	27
2.6	Fermentación en medio sólido	31
2.6.1	Definición	31
2.6.2	Soportes empleados en la fermentación en medio sólido	32
2.6.3	Condiciones ambientales que afectan la producción de enzimas	34
2.6.4	Condiciones nutricionales que afectan la producción de enzimas	42
2.6.5	Medición en línea de parámetros durante la fermentación en medio sólido	43
2.7	Enzimas	47
2.7.1	Cloroetano hidrolasa	47
2.7.2	Feruloil esterasa	49
2.7.3	Pectinasa	52
2.7.4	Xilanasa	53
2.7.5	Celulasa	54
2.8	Diseño de experimentos	55

---

2.8.1	Diseño de mezclas	55
2.8.2	Diseño tipo Plackett-Burman	56
2.8.3	Diseño factorial central compuesto	58
3.	Antecedentes directos	59
4.	Justificación	62
5.	Hipótesis	63
6.	Objetivos	64
6.1	Objetivo general	64
6.2	Objetivos particulares	64
7.	Materiales y métodos	65
7.1	Microorganismos	65
7.1.1	Microorganismos y conservación	65
7.1.2	Producción del inóculo y conteo de esporas	65
7.2	Soporte/sustrato	66
7.2.1	Origen y tratamiento de la pulpa de café	66
7.2.2	Origen y tratamiento del orujo de olivo	66
7.3	Condiciones de cultivo	67
7.3.1	Índice de potencia	67
7.3.2	Estimación de la hidrólisis de ácido clorogénico en tubos de ensaye	69
7.3.3	Fermentación en matraces: pulpa de café	69
7.3.4	Fermentación en columnas: pulpa de café	69
7.3.5	Diseño Plackett-Burman	70
7.3.6	Diseño factorial central compuesto	71
7.3.7	Validación de la optimización	72
7.4	Tratamiento de las muestras	72
7.4.1	Extracción del ácido clorogénico total: hidrólisis alcalina	72
7.4.2	Extracción del ácido clorogénico libre	73
7.4.3	Determinación del ácido clorogénico biotransformado	73
7.4.4	Obtención del extracto enzimático	73
7.4.5	Extracción enzimática del ácido clorogénico: diseño de mezclas	73
7.4.6	Extracción enzimática del ácido clorogénico en la pulpa de café	74
7.5	Técnicas analíticas	74
7.5.1	Actividad feruloil esterasa	74
7.5.2	Actividad pectinasa, xilanasa y celulasa	75

---

7.5.3 Cromatografía de gases	75
7.5.4 Cromatografía líquida: HPLC	75
7.5.5 Humedad	76
7.5.6 Actividad de agua	76
7.5.7 Medición de pH	76
7.6 Técnicas desarrolladas en este trabajo	76
7.6.1 Cuantificación de la actividad pectinasa, xilanasas y celulasas en cajas Petri	76
7.6.2 Actividad clorogenato esterasa por espectrofotometría	78
7.7 Sistema de respirómetro desarrollado	79
7.8 Análisis estadístico	84
8 Estrategia experimental	85
9 Desarrollo de metodologías (enzimática y respirometría)	88
9.1 Estudio y evaluación de la cuantificación de la actividad xilanasas, pectinasas y celulasas en cajas de Petri	88
9.1.1 Actividad pectinasa en cajas de Petri	93
9.1.2 Actividad xilanasas en cajas de Petri	94
9.1.3 Actividad celulasas en cajas de Petri	96
9.1.4 Conclusiones sobre la cuantificación de la actividad enzimática en cajas de Petri	98
9.2 Adaptación de una técnica para determinar de forma indirecta la actividad clorogenato esterasa a partir de medir la hidrólisis del ácido clorogénico	99
9.2.1 Conclusiones de la técnica para determinar de forma indirecta la actividad clorogenato esterasa	103
9.3 Evaluación del monitoreo en línea de CO <sub>2</sub> y O <sub>2</sub> (respirometría)	104
9.3.1 Evaluación del monitoreo en línea por dos sistemas de respirometría	104
9.3.2 Comparación del modelo de Gompertz y el modelo Logístico	108
9.3.3 Conclusiones de la evaluación del monitoreo en línea de la respirometría	112
10 Pre-selección y selección de las cepas	113
10.1 Pre-selección de las cepas	113
10.1.1 Índice de potencia con sustratos naturales: PC y PCT	114
10.1.2 Índice de potencia con pectina, xilano y CM-celulosa	117
10.1.3 Hidrólisis del ácido clorogénico por la posible producción de la clorogenato esterasa	121
10.1.4 Conclusiones de la pre-selección	125
10.2 Selección de las cepas	126

---

10.2.1 Producción de los extractos enzimáticos por fermentación en matraces y en columnas	126
10.2.1.1 Fermentación en matraces	126
10.2.1.2 Fermentación en columnas	134
10.2.2 Extracción enzimática del ácido clorogénico	138
10.2.3 Evaluación de la cantidad de ácido clorogénico y ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café durante la fermentación en matraces y en columnas	146
10.2.4 Conclusiones de la selección de las cepas	150
11 Efecto de las actividades enzimáticas despolimerizantes usando solamente enzimas comerciales sobre la extracción del ácido clorogénico	152
11.1 Conclusiones del efecto de las actividades enzimáticas despolimerizantes sobre la extracción del ácido clorogénico	165
12 Optimización de las condiciones de cultivo para la obtención de un extracto enzimático capaz de extraer el ácido clorogénico sin hidrolizarlo	167
12.1 Diseño experimental tipo Plackett-Burman para la producción de enzimas	167
12.2 Diseño factorial central compuesto para la producción de enzimas	180
12.3 Evaluación de la extracción enzimática del ácido clorogénico presente en la pulpa de café	195
12.3.1 Obtención del extracto enzimático por fermentación en medio sólido con las condiciones optimizadas	195
12.3.2 Extracción del ácido clorogénico con el extracto enzimático producido por fermentación en medio sólido bajo las condiciones optimizadas	198
12.4 Conclusiones de la optimización de las condiciones de cultivo para la obtención del extracto crudo y de la extracción enzimática del ácido clorogénico	200
13 Discusión general	202
14 Conclusiones	212
15 Perspectivas	214
16 Referencias	215
17 Anexos	229

---

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 2.1.</b> Distribución porcentual de las partes de la cereza del café en base seca	7
<b>Tabla 2.2.</b> Composición química de la pulpa de café en base seca	9
<b>Tabla 2.3.</b> Energía obtenida de la pulpa de café en Tanzania	10
<b>Tabla 2.4.</b> Composición química de la cascarilla en base seca	11
<b>Tabla 2.5.</b> Composición química del mucílago	11
<b>Tabla 2.6.</b> Composición química del pergamino	12
<b>Tabla 2.7.</b> Microorganismos cultivados en pulpa y cascarilla de café	12
<b>Tabla 2.8.</b> Composición química del orujo de olivo	34
<b>Tabla 2.9.</b> Clasificación de las feruloil esterasas	50
<b>Tabla 2.10.</b> Constantes cinéticas de la feruloil esterasa en presencia de metil ferulato	51
<b>Tabla 7.1.</b> Factores del diseño experimental tipo Plackett-Burman	71
<b>Tabla 7.2.</b> Niveles reales y codificados de los factores del diseño factorial central compuesto	72
<b>Tabla 9.1.</b> Ensayos en cajas de Petri utilizados para medir las actividades enzimáticas	89
<b>Tabla 9.2.</b> Análisis estadístico de los halos de hidrólisis con diferentes volúmenes de gota	90
<b>Tabla 9.3.</b> Análisis de las curvas obtenidas en diferentes periodos de incubación	91
<b>Tabla 9.4.</b> Análisis estadístico de la regresión lineal para la actividad de la pectinasa comercial	94
<b>Tabla 9.5.</b> Análisis estadístico de la regresión lineal para la actividad de la xilanasa comercial	95
<b>Tabla 9.6.</b> Análisis estadístico de la regresión lineal para la actividad de la celulasa comercial	97
<b>Tabla 9.7.</b> Coeficientes de extinción molar y análisis estadístico	102
<b>Tabla 9.8.</b> Validación de la técnica para medir la actividad CIE	103
<b>Tabla 9.9.</b> Parámetros estimados para cada modelo y análisis estadístico para C1	111
<b>Tabla 9.10.</b> Parámetros estimados para cada modelo y análisis estadístico para C2	111
<b>Tabla 10.1.</b> Conversión de ACl hidrolizado y rendimientos molares	123
<b>Tabla 10.2.</b> Actividades enzimáticas máximas medidas durante la fermentación en matraces para las 3 cepas ensayadas	133
<b>Tabla 10.3.</b> La $\mu_{CO_2}$ estimada y la actividad FAE medida en extractos enzimáticos producidos por FMS para cada una de las cepas ensayadas	136
<b>Tabla 10.4.</b> Concentración de ACl y AH en la pulpa de café	138

---

<b>Tabla 10.5.</b> Extracción enzimática del ACl y de los AH esterificados a la pared celular de la PC	142
<b>Tabla 10.6.</b> Extracción enzimática del ACl y los AH utilizando mezclas de extractos enzimáticos y pectinasa comercial	145
<b>Tabla 10.7.</b> Concentración de ACl y AH en la PC y PCF en la fermentación en matraces	148
<b>Tabla 10.8.</b> Composición de ACl y AH en la PC y PCF en la fermentación en columnas	149
<b>Tabla 11.1.</b> Extracción enzimática del ACl y AH en el diseño de mezclas	153
<b>Tabla 12.1.</b> Condiciones para cada uno de los ensayos del diseño tipo Plackett-Burman	169
<b>Tabla 12.2.</b> Actividad respiratoria estimada, humedad y pH medidos para cada una de las corridas ensayadas	170
<b>Tabla 12.3.</b> Actividades enzimáticas medidas en las corridas ensayadas en el diseño experimental tipo Plackett-Burman	172
<b>Tabla 12.4.</b> Condiciones para cada uno de los ensayos del diseño factorial central compuesto	182
<b>Tabla 12.5.</b> Actividad respiratoria estimada, $a_w$ , pH y contenido de humedad medidos en cada una de las corridas del diseño factorial central compuesto	184
<b>Tabla 12.6.</b> Variables respuesta medidas en el diseño factorial central compuesto	187
<b>Tabla 12.7.</b> Actividades enzimáticas medidas y estimadas para cada uno de los ensayos	197
<b>Tabla 12.8.</b> Extracción enzimática del ACl y los AH	198
<b>Tabla A-1.</b> Análisis estadístico de los modelos Logístico y de Gompertz para la fermentación en columnas	229
<b>Tabla A-2.</b> Análisis estadístico de los modelos Logístico y de Gompertz para el diseño experimental tipo Plackett-Burman	229
<b>Tabla A-3.</b> Análisis estadístico de la TPC de los modelos Logístico y de Gompertz para el diseño factorial central compuesto	230
<b>Tabla A-4.</b> Análisis estadístico de la TCO de los modelos Logístico y de Gompertz para el diseño factorial central compuesto	231
<b>Tabla A-5.</b> Análisis estadístico de los modelos probados para la variable respuesta concentración de ACl usada como variable respuesta	232
<b>Tabla A-6.</b> Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo cuadrático para el ACl extraído	232
<b>Tabla A-7.</b> Análisis estadístico de los modelos probados para la concentración de AC como variable respuesta	233

---

---

<b>Tabla A-8.</b> Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo especial cúbico para la extracción del AC	233
<b>Tabla A-9.</b> Análisis estadístico de los modelos probados para la concentración de AF como variable respuesta	234
<b>Tabla A-10.</b> Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo cúbico para el AF extraído	234
<b>Tabla A-11.</b> Análisis estadístico de los modelos probados para la concentración de ApC como variable respuesta	235
<b>Tabla A-12.</b> Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo cúbico para el ApC extraído	235
<b>Tabla A-13.</b> Análisis estadístico de los efectos normalizados de los factores sobre la APec, AXil y ACel	241
<b>Tabla A-14.</b> Análisis estadístico de los efectos normalizados de los factores sobre la ACIE	241
<b>Tabla A-15.</b> Análisis estadístico del modelo que se ajustó a la APec usada como la variable respuesta	242
<b>Tabla A-16.</b> Análisis estadístico del modelo que se ajustó a la AXil usada como la variable respuesta	243
<b>Tabla A-17.</b> Análisis estadístico del modelo que se ajustó a la ACIE usada como la variable respuesta	243

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 2.1.</b> Partes del fruto del café	6
<b>Figura 2.2.</b> Estructura química de la celulosa	13
<b>Figura 2.3.</b> Estructura química y esquema del xilano	14
<b>Figura 2.4.</b> Estructura química y esquema de la pectina	15
<b>Figura 2.5.</b> Esquema del ácido clorogénico esterificado a la pared celular	16
<b>Figura 2.6.</b> Ácidos hidroxicinámicos	17
<b>Figura 2.7.</b> Representación esquemática de la transformación de los AH	20
<b>Figura 2.8.</b> Estructura química del ácido clorogénico	21
<b>Figura 2.9.</b> Estructuras de las diferentes formas del ACI	22
<b>Figura 2.10.</b> Ruta metabólica del ácido clorogénico	23
<b>Figura 2.11.</b> Biotransformación del ácido clorogénico por bacterias ácido-acéticas	28
<b>Figura 2.12.</b> Biotransformación del ácido clorogénico por <i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	29
<b>Figura 2.13.</b> Diferentes mecanismos de reacción que presenta la CIE	30
<b>Figura 7.1.</b> Representación esquemática del halo de hidrólisis y diámetro de la colonia de <i>Trametes</i> sp. en cajas Petri con PCT	68
<b>Figura 7.2.</b> Diagrama esquemático del sistema de respirómetro desarrollado	80
<b>Figura 7.3.</b> Esquema del funcionamiento del sistema de respirómetro desarrollado	82
<b>Figura 7.4.</b> Diagrama esquemático de eventos para una sola válvula	83
<b>Figura 8.1.</b> Diagrama de la estrategia experimental seguida para alcanzar los objetivos planteados	86
<b>Figura 9.1.</b> Ensayos con xilanasa comercial a diferentes concentraciones y periodos de incubación	90
<b>Figura 9.2.</b> Perfiles de actividad enzimática para diferentes concentraciones de xilanasa comercial por un periodo de 3 a 70 h	91
<b>Figura 9.3.</b> Actividad pectinasa en cajas Petri con 2 g/L de pectina a las 24, 48 y 72 h	93
<b>Figura 9.4.</b> Actividad xilanasa en cajas Petri con 2 g/L de xilano a las 24, 48 y 72 h	95
<b>Figura 9.5.</b> Actividad celulasa en cajas Petri con 2 g/L de CM-celulosa a las 24, 48 y 72 h	96
<b>Figura 9.6.</b> Espectros de absorción del ACI, AC y AQ	99
<b>Figura 9.7.</b> Espectros de absorción a diferentes concentraciones	100
<b>Figura 9.8.</b> Espectros de absorción a diferentes pH	101
<b>Figura 9.9.</b> CO <sub>2</sub> producido, O <sub>2</sub> consumido y flujo medido durante la FMS usando el medio de cultivo 1	105
<b>Figura 9.10.</b> CO <sub>2</sub> producido O <sub>2</sub> consumido y flujo medido durante la FMS usando el medio	107

de cultivo 2	
<b>Figura 9.11.</b> Perfil de producción de CO <sub>2</sub> y consumo de O <sub>2</sub> para C1, ajustados con el modelo Logístico y el modelo de Gompertz	109
<b>Figura 9.12.</b> Perfil de producción de CO <sub>2</sub> y consumo de O <sub>2</sub> para C2, ajustados con el modelo Logístico y el modelo de Gompertz	110
<b>Figura 10.1.</b> IP de cada cepa en cajas Petri con 2 g/L de PC incubadas por 26 h y 43 h	114
<b>Figura 10.2.</b> IP de cada cepa en cajas Petri con 2g/L de PCT incubadas por 26 h y 43 h.	116
<b>Figura 10.3.</b> IP de cada una de las cepas en cajas Petri con 2g/L de pectina incubadas por 26 h y 43 h	118
<b>Figura 10.4.</b> IP de cada una de las cepas en cajas Petri con 2 g/L de xilano incubadas por 26 h y 43 h	119
<b>Figura 10.5.</b> IP de cada una de las cepas en cajas Petri con 2g/L de CM-celulosa incubadas por 26 h y 43 h	120
<b>Figura 10.6.</b> IP de cada unas de las cepas en cajas Petri con 0.5 g/L de ACI incubadas por 26 h y 43 h	122
<b>Figura 10.7.</b> Perfil de actividades enzimáticas de <i>R. pusillus</i>	127
<b>Figura 10.8.</b> Humedad y pH durante la fermentación en matraces de <i>R. pusillus</i>	128
<b>Figura 10.9.</b> Perfil de actividades enzimáticas de <i>Trametes</i> sp.	129
<b>Figura 10.10.</b> Humedad y pH durante la fermentación en matraces de <i>Trametes</i> sp.	130
<b>Figura 10.11.</b> Perfil de actividades enzimáticas de <i>A. tamaritii</i>	131
<b>Figura 10.12.</b> Humedad y pH durante la fermentación en matraces de <i>A. tamaritii</i>	132
<b>Figura 10.13.</b> Producción de CO <sub>2</sub> para las cuatro cepas seleccionadas	134
<b>Figura 10.14.</b> Extracción enzimática del ACI por los extractos producidos por <i>R. pusillus</i> , <i>Trametes</i> sp. y <i>A. tamaritii</i> a 40°C y 30°C	139
<b>Figura 10.15.</b> Microscopia de la PC utilizada	140
<b>Figura 11.1</b> Diseño simplex centroide con puntos adicionales en el interior	152
<b>Figura 11.2.</b> Curvas de nivel para la extracción enzimática del ACI con diferentes mezclas de la APec, AXil y ACel	155
<b>Figura 11.3.</b> Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de ACI	156
<b>Figura 11.4.</b> Curvas de nivel para la extracción enzimática del AC con diferentes mezclas de la APec, AXil y ACel	159
<b>Figura 11.5.</b> Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de AC	160

---

<b>Figura 11.6.</b> Curvas de nivel para la extracción enzimática del AF con diferentes mezclas de la APec, AXil y ACel	161
<b>Figura 11.7.</b> Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de AF	162
<b>Figura 11.8.</b> Curvas de nivel para la extracción enzimática del ApC con diferentes mezclas de la APec, AXil y ACel	163
<b>Figura 11.9.</b> Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de ApC	164
<b>Figura 12.1.</b> Diseño experimental tipo Plackett-Burman	168
<b>Figura 12.2.</b> Producción de CO <sub>2</sub> de las corridas ensayadas M1 - M8 del diseño experimental tipo Plackett-Burman	170
<b>Figura 12.3.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> , durante la FMS de <i>R. pusillus</i> para las condiciones del ensayo M8	173
<b>Figura 12.4.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> , durante la FMS de <i>R. pusillus</i> para las condiciones del ensayo M3	174
<b>Figura 12.5.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> , durante la FMS de <i>R. pusillus</i> para las condiciones del ensayo M6	176
<b>Figura 12.6.</b> Diagrama de Pareto de los efectos de cada uno de los factores sobre la APec y la AXil	178
<b>Figura 12.7.</b> Diagrama de Pareto de los efectos de cada uno de los factores sobre la ACIE	178
<b>Figura 12.8.</b> Esquema del diseño factorial central compuesto	181
<b>Figura 12.9.</b> Diseño factorial central compuesto	181
<b>Figura 12.10.</b> Producción de CO <sub>2</sub> de las 16 corridas (M1 – M16) del diseño factorial central compuesto	183
<b>Figura 12.11.</b> Coeficiente respiratorio de las 16 corridas ensayadas (M1 – M16) del diseño factorial central compuesto	186
<b>Figura 12.12.</b> Curvas de nivel para los 3 factores ensayados sobre la APec en el diseño factorial central compuesto	190
<b>Figura 12.13.</b> Curvas de nivel para los 3 factores ensayados sobre la AXil en el diseño factorial central compuesto	191
<b>Figura 12.14.</b> Curvas de nivel normalizadas para los 3 factores ensayados sobre la APec y AXil en el diseño factorial central compuesto	192
<b>Figura 12.15.</b> Curvas de nivel para los 3 factores ensayados sobre la ACIE en el diseño factorial central compuesto	194

<b>Figura 12.16.</b> Producción de CO <sub>2</sub> bajo las condiciones de cultivo determinadas en el diseño factorial central compuesto	196
<b>Figura A-1.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> para el ensayo M1	236
<b>Figura A-2.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> para el ensayo M2	237
<b>Figura A-3.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> para el ensayo M4	238
<b>Figura A-4.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> para el ensayo M5	239
<b>Figura A-5.</b> Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO <sub>2</sub> para el ensayo M7	240

---

**ÍNDICE DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS**

AC	Ácido cafeico	FMS	Fermentación en medio sólido
ACI	Ácido clorogénico	FAE	Feruloil esterasa
AF	Ácido ferúlico	OO	Orujo de olivo
AH	Ácidos hidroxicinámicos	IP	Índice de potencia
ApC	Ácido <i>p</i> -cumárico	MF	Materia fermentada
AP	Ácido protocatecoico	MS	Materia seca
AQ	Ácido quínico	MSI	Materia seca inicial
$a_w$	Actividad de agua	PC	Pulpa de café
ACel	Actividad celulolítica	PCH	Pulpa de café húmeda
ACIE	Actividad clorogenato esterasa	PCF	Pulpa de café fermentada
APec	Actividad pectinolítica	PCT	Pulpa de café tratada
AXil	Actividad xilanolítica	$\mu_{CO_2}$	Tasa específica de producción de CO <sub>2</sub>
BC	Bagazo de caña	TPC	Tasa de producción de CO <sub>2</sub>
CIE	Clorogenato esterasa	TCO	Tasa de consumo de O <sub>2</sub>
CR	Coficiente respiratorio	SS	Soporte sustrato
HPLC	Cromatografía de alta resolución		

## 1 INTRODUCCIÓN

México es considerado el 8° productor del mundo de café produce entre 35 y 79 millones de toneladas al año de café cereza (INEGI, 2009). La pulpa de café es un residuo rico en azúcares y pectina, que podría convertirse en un serio problema de contaminación. Si se deposita sin tratamiento sobre terrenos o es vertida a los ríos, produce malos olores y fauna indeseable. En las pilas de pulpa de café la descomposición natural se lleva sólo a cabo en la parte superficial mientras que en las capas más profundas donde hay ausencia de oxígeno la pulpa se torna amarilla mostaza, y se suspende su descomposición (Aranda, 1998).

La pulpa de café ha sido utilizada para obtener pectinasas por fermentación en medio sólido (Antier y col., 1993). Además, ha sido usada para alimentación animal debido a su alto contenido de proteína (Peñaloza y col., 1985). La presencia de compuestos tóxicos como la cafeína y otros ácidos fenólicos en la pulpa de café, limitan su uso como alimento de ganado (Roussos y col., 1995). Sin embargo, puede ser aprovechada para la obtención de compuestos de alto valor agregado como son los ácidos hidroxicinámicos (ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico, ácido sinápico) y el ácido clorogénico que es el más abundante se encuentra en cantidades de hasta 3000 mg/kg de pulpa de café (Labat y col., 2002).

El ácido clorogénico presenta actividad antiviral, anticarcinogénica, antioxidante y antiinflamatoria; es usado como modificador del sabor e inhibidor de la glucosa-6-fosfatasa (Bushman y col., 2002; Solis y Herrera, 2005; Schwab y col., 2001). Su precio en el mercado, extraído con disolventes orgánicos a partir de granos de café verde con una pureza >95%, está en aproximadamente \$16 000/kg (3). Un análisis económico realizado muestra que las utilidades que se pueden obtener por tonelada de pulpa de café procesado para la obtención de compuestos fenólicos puede alcanzar cerca de los \$45 000/ton. El ácido clorogénico representaría el 84.3% de las utilidades, seguido del ácido cafeico con un 5.9% y el ácido ferúlico con un 2.3%. Por lo que resulta de interés la extracción del ácido clorogénico, un producto de alto valor agregado de un residuo de bajo valor como es la pulpa de café.

Actualmente el ácido clorogénico es extraído por medio de solventes orgánicos como cloroformo y diclorometano, que son peligrosos y nocivos para la salud humana y el medio ambiente. La extracción con solventes resulta poco selectiva lo que provoca altos costos en procesos de purificación que se deberán llevarse a cabo (Azevedo y col., 2008). En este trabajo se propone una alternativa para la extracción del ácido clorogénico mediante la extracción enzimática que permite hidrolizar la pared celular de las plantas por medio de enzimas hidrolíticas. La extracción enzimática resulta selectiva, económica y se obtiene un producto natural (Kroon y Williamson, 1999). La principal desventaja probable que puede presentarse es que el ácido clorogénico puede ser hidrolizado por esterasas, como la clorogenato esterasa, ocasionando pérdidas en la extracción del ácido clorogénico (Adachi y col., 2008). Hasta donde tenemos conocimiento no se ha reportado un método adecuado de extracción enzimática del ácido clorogénico. El presente estudio desea contribuir al estado del arte de la extracción enzimática del ácido clorogénico empleando enzimas producidas por fermentación en medio sólido.

En el trabajo de Maestría con el nombre “Extracción enzimática de ácidos hidroxicinámicos presentes en la pulpa de café” se mostró el potencial de usar enzimas producidas por fermentación en medio sólido, con capacidad de liberar compuestos fenólicos, como los ácidos hidroxicinámicos, de la pared celular de la pulpa de café. Se determinó que para mejorar las eficiencias de extracción enzimática de los compuestos fenólicos era necesario que el extracto enzimático presentara diversas actividades enzimáticas, tanto desesterificantes como despolimerizantes.

En la tesis doctoral se llevó a cabo la extracción del ácido clorogénico esterificado a la pared celular de la pulpa de café por extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido (FMS). En la sección de la revisión bibliográfica, se muestran los antecedentes más relevantes a este trabajo, así mismo se indica la justificación, hipótesis y objetivos de la tesis. Los resultados están organizados en cuatro bloques, a) Desarrollo de metodología (enzimática y de respirometría), b) Pre-selección y selección de cepas, c) Efecto de las enzimas despolimerizantes sobre la obtención del ácido clorogénico y d) Optimización de la producción de extractos enzimáticos para la obtención del ácido clorogénico.

En este sentido, se desarrollaron y evaluaron diversas técnicas analíticas como la cuantificación de la actividad enzimáticas (pectinasa, xilanasas y celulasa) en cajas de Petri y la cuantificación de la actividad clorogenato esterasa por espectrofotometría. Se desarrolló un sistema para el análisis en línea de la respirometría durante los cultivos sólidos a través de la medición de la concentración de CO<sub>2</sub> (%) producido, O<sub>2</sub> (%) consumido y el flujo (ml/min) de la fase gaseosa. Este sistema nos permitió relacionar producción de CO<sub>2</sub> y producción de las enzimas pectinasa, xilanasas y celulasa. Y clorogenato esterasa

Una vez desarrollada la metodología requerida se realizó una pre-selección de las cepas fúngicas que presentaran actividad pectinasa, xilanasas y celulasa. Se buscó que la actividad clorogenato esterasa, enzima responsable de la hidrólisis del ácido clorogénico, fuera lo más baja posible. La selección de las cepas se realizó tomando en cuenta la capacidad de los extractos enzimáticos fúngicos producidos por fermentación en medio sólido para extraer el ácido clorogénico de la pulpa de café.

A partir de un diseño de mezclas se determinó con las enzimas comerciales pectinasa, xilanasas y celulasa cuál era el conjunto de actividades enzimáticas despolimerizantes que debían estar mayormente presentes en el extracto enzimático crudo para extraer el ácido clorogénico. Con ayuda de un diseño experimental tipo Plackett-Burman seguido de un diseño factorial central compuesto se determinaron las condiciones de cultivo óptimas para obtener un extracto enzimático crudo que presente las actividades enzimáticas necesarias para extraer el ácido clorogénico. Finalmente, con el extracto enzimático crudo se realizó la extracción enzimática del ácido clorogénico esterificado de la pulpa de café.

Una vez concluido el trabajo experimental se presenta una sección de discusión general, conclusiones y perspectivas, seguida de las referencias, anexos y productos científicos derivados de la tesis doctoral.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este capítulo se presenta la revisión bibliográfica realizada durante el desarrollo de este estudio. En la sección “El café y sus subproductos” se desarrolla el tema de “La pulpa de café” el cual es el subproducto de interés para este estudio. En la sección de la “Pared celular” se presenta la composición de la pared celular y como se encuentra esterificado el ácido clorogénico a ésta.

En la sección de “Compuestos fenólicos” se presentan los ácidos hidroxicinámicos y ácidos clorogénicos que se encuentran en la pulpa de café, su importancia, usos y propiedades. En la sección “Métodos de extracción del ácido clorogénico” se presentan los métodos químicos y biológicos hasta el momento reportados para la extracción del ácido clorogénico. Además en la sección “Transformación y biotransformación del ácido clorogénico” se hace un resumen de cómo este compuesto puede usarse para producir otros compuestos de interés industrial.

Las enzimas usadas en este trabajo se produjeron por “Fermentación en medio sólido” por lo que en esta revisión bibliográfica se tocó este tema. En esta sección se presenta los soportes empleados y las condiciones nutricionales y ambientales que afectan la producción de las enzimas, así como la medición en línea de algunos parámetros durante la FMS lo cual fue importante para la obtención de los extractos enzimáticos crudos. En la sección de “Enzimas” se resume las características de las 5 enzimas determinadas en este estudio. Se evaluaron los extractos enzimáticos crudos para la extracción del ácido clorogénico de 6 cepas de hongos filamentosos por lo que en la sección de “Hongos” se resumen algunas características importantes de estas cepas fúngicas.

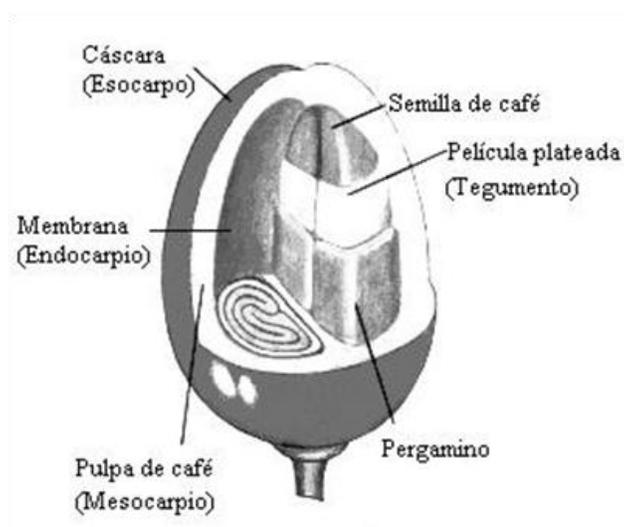
Por último en la sección de “Diseño de experimentos” se muestran las herramientas estadísticas que se usaron para determinar las condiciones de reacción enzimática y optimización de las condiciones de medio de cultivo para la producción de enzimas que nos permitieron extraer el ácido clorogénico esterificado a la pared celular de la pulpa de café.

## 2.1 EL CAFÉ Y SUS SUBPRODUCTOS

El INEGI 2010 estima que en México, se consume cerca de 700 g/habitante de café soluble. Se estima que por cada 2 toneladas de café procesado se produce 1 tonelada de pulpa de café y 0.18 toneladas de cascarilla de café. La pulpa de café genera problemas de contaminación produciendo malos olores y fauna indeseable. Es indispensable encontrar alternativas para la disposición de los subproductos generados durante el procesamiento de la cereza de café. En esta sección se hace una descripción del fruto del café, los subproductos obtenidos del procesamiento de la cereza del café y los posibles usos de los subproductos del café.

### 2.1.1 El café

Con el nombre de café se designa a las semillas de las plantas del género *Coffea* desprovistas por completo de sus vainas y de sus tegumentos (envoltura plateada). El árbol del café es una planta dicotiledónea, pertenece a la familia de las *Rubiaceae*. Según la especie, alcanza una altura de 3 - 12 m. Da frutos una vez al año, 6 ó 9 meses después de florecer, la semilla representa el 45% del fruto y el otro 55% representa la cáscara y la pulpa. Los frutos del árbol son verdes al principio, se colorean de rojo a violeta al madurar y contiene en su pulpa (mesocarpio) dos semillas que se conectan por su cara lisa. Están envueltas por una membrana amarillenta, transparente y sólidamente adherida (tegumento) y luego recubiertas por una capa córnea o apergaminada que es el endocarpio como se muestra en la Figura 2.1 (Belitz y Grosh, 1997).



**Figura 2.1.** Partes del fruto del café

Existen 70 especies de *Coffea* pero sólo dos tienen una importancia económica: *Coffea arabica* que aporta alrededor del 75% de la cosecha mundial y *C. canephora*. Estas dos especies son comercialmente conocidas como *C. arabica* y *C. robusta*. Mientras que *C. liberica* y otras especies representan menos del 1% del café producido. *C. arabica* es cultivada a una altitud de 500 - 2000 m y *C. robusta* es cultivada a una altitud de 0 – 1000 m. La obtención de la semilla de café se realiza generalmente por beneficiado húmedo, en este método se llevan los frutos al despulpador, que mediante un sistema de discos y rodillos graduales de superficie áspera, elimina la pulpa por compresión sin dañar las semillas. Para producir 1 kg de semillas comerciales son necesarios, ya sea el caso, 6.38 kg de *C. arabica*, 4.35 kg en el *C. canephora* o de 11.5 kg en el *C. liberica*. Sin embargo el *C. liberica* es más susceptible de enfermedades (Belitz y Grosh, 1997).

Las semillas así obtenidas contienen aún, el endocarpo, el tegumento y una considerable cantidad de pulpa, por lo que se dejan fermentar de 12 a 48 horas a la intemperie. Los residuos se degradan bajo la acción de enzimas pectinolíticas propias del café y por la acción de microorganismos. Después de lavar las semillas, se secan y se pasan por un descascarillador para retirar el endocarpo y de ahí se procesa (Belitz y Grosh, 1997). En la producción de café soluble en polvo el café cereza constituye entre 6 - 9.5% (peso en base fresca), el remanente (90.5 - 94%) son subproductos como el agua, mucílago, cáscara y pulpa de café (Murthy y Manonmani, 2008). Durante el despulpado del fruto se

produce un 40% de pulpa de café en base fresca y la diferencia es el café despulpado del cual, 11.8% corresponde al mucílago del café, 6.1% al pergamino del café, 43.2% al grano verde del café y 38.9% al grano de café listo para ser tostado (Belitz y Grosh, 1997). La distribución porcentual de las partes de la cereza de café depende de la variedad de café como se muestra en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Distribución porcentual de las partes de la cereza del café en base seca

	Variedad de café	
	<i>C. arabica</i>	<i>C. canephora</i>
Pulpa	26.5	29.6
Pergamino	10.0	11.2
Mucílago	13.7	7.5
Fruto de café	50.0	51.7

Se estima que el 77% (95.6 millones de sacos) del café consumido es tostado y molido, este mercado está dominado por grandes empresas multinacionales como: Kraft Foods, Sara Lee/De y Nestlé. De las exportaciones mundiales de café tostado en 2006, la Unión Europea en el 2006 contribuyó con el 83%, Estados Unidos con el 15% y otros países productores con el 2% (2).

A nivel mundial en el 2007 se consumieron 30 millones de sacos de café soluble aproximadamente. Se tiene registrado que en el ciclo 2006-2007 se exportaron 97.6 millones de sacos de café (\$12.4 billones de dólares) y del 2007-2008 se exportaron 94 millones de sacos (\$13 billones de dólares). Cada saco de café presenta 60 kg de café cereza por lo que se estima que del 2006-2007 se produjeron 3.91 millones de toneladas de pulpa de café y del 2007-2008 se produjeron 3.76 millones de toneladas en el mundo de pulpa de café (2).

Los principales productores de café en el mundo son (millones de sacos de café): Brasil (28), Colombia (15), Indonesia (7), Uganda (5.5), India (5), Guatemala (5), Vietnam (5), México (4) y Etiopía (4) (Pandey y col., 2000).

México es considerado el 8° productor y exportador de café del mundo debido a que produce entre 35 y 79 millones de toneladas al año de café cereza. En 1980, el Estado de Veracruz estaba considerado como el más avanzado en el cultivo del café, produciendo cerca de las 2/3 partes de la cosecha de café en México; seguido por los Estados de Colima, Chiapas, Guerrero, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Tabasco. Hoy en día Chiapas es el estado con la mayor producción de café seguido por Veracruz y Oaxaca. México consume alrededor de un millón de sacos de 60 kg de café al año, lo que representa cerca de 700 g/habitante. Esta cifra es muy baja en comparación con otros países como los nórdicos de Europa que en promedio consumen 11 Kg de café/habitante al año.

A continuación se realiza una descripción de los diferentes subproductos del café producidos durante el despulpado, haciendo énfasis en la pulpa de café, que es uno de los residuos que se usaron en este estudio para la extracción de ácido clorogénico y producción de enzimas por fermentación en medio sólido.

### **2.1.2 Pulpa de café**

La pulpa de café (PC) representa un 40% del peso en base fresca (Belitz y Grosh, 1997) y un 26% de PC en base seca (Urbaneja y col., 1996). Está compuesta del mesocarpio que es una capa de tejido esponjoso de 5 mm de espesor, rico en azúcares y pectinas. La PC es un residuo rico en azúcares y pectina, que se ha convertido en un serio problema por los grandes volúmenes que se producen, provocando problemas de contaminación por su alta demanda bioquímica de oxígeno y su rápida fermentación. Si se deposita sin tratamiento sobre terrenos o es vertida a los ríos, produce malos olores, fauna indeseable y eutroficación. En las pilas de pulpa de café la descomposición natural se lleva sólo a cabo en la parte superficial mientras que en las capas más profundas donde hay ausencia de oxígeno la pulpa se torna amarilla mostaza, en este punto la PC detiene su degradación (Aranda, 1998). La composición química de la PC varía de acuerdo a varios factores como la variedad del cultivo, la composición del suelo de cultivo, la etapa de madurez del fruto, las prácticas y tratamientos aplicados (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Composición química de la pulpa de café en base seca

	<b>Cantidad</b>	<b>Referencia</b>
Fibra	30-40%	Adams y Ghaly, 2007
Azúcares	14.4-27%	Adams y Ghaly, 2007; Antier y col., 1993
Fructosa	10-15%	Antier y col., 1993
Sacarosa	2.8-3.2%	Antier y col., 1993
Galactosa	1.9-2.4%	Antier y col., 1993
Pectinas	6.5–12.4 %	Bressani y Braham, 1980; Antier y col., 1993
Lignina	12.2-21.5%	Bressani y Braham, 1980; Molina y col., 1990
Celulosa	17.7-25.3%	Bressani y Braham, 1980; Molina y col., 1990; Peñaloza y col., 1985
Hemicelulosa	2.3 3.2%	Bressani y Braham, 1980; Molina y col., 1990
Ácido clorogénico	3600-7000 mg/kg	Labat y col., 2000; Torres-Mancera y col., 2011
Ácido cafeico	1660-3100 mg/kg	Benoit y col., 2006; Labat y col., 2000; Torres-Mancera y col., 2011
Ácido ferúlico	100-240 mg/kg	Benoit y col., 2006; Roussos y col., 1995; Torres-Mancera y col., 2011
Ácido <i>p</i> -cumárico	80 mg/kg	Benoit y col., 2006; Torres-Mancera y col., 2011

Las plantas dicotiledóneas como el café tienen concentraciones similares de celulosa, hemicelulosa y pectina, mientras las monocotiledóneas tienen menor concentración de pectina (Bressani y Braham, 1980).

La PC tiene un valor energético de 2200 kcal/kg, puede ser utilizada como complemento alimenticio. Presenta algunos factores tóxicos también denominados anti fisiológicos (cafeína) y anti nutricionales (polifenoles) que limitan su uso en la alimentación animal. Los polifenoles interfieren en la asimilación de los nutrientes, el ácido tánico precipita las proteínas, la cafeína tiene un efecto diurético, ocasiona deshidratación y por tanto eliminación de compuestos nitrogenados (Acosta y col., 1997).

La inclusión de la PC ensilada con y sin melaza a niveles superiores al 5% no se recomienda en la alimentación de aves debido a que ocasiona efectos detrimentales en los valores de digestibilidad de la materia seca, del nitrógeno y de la energía metabolizable (Acosta y col., 1997).

La destoxificación de la PC se puede dar por métodos físicos, químicos y microbiológicos. Los métodos físicos y químicos con los que se tiene mejores resultados

pero son caros. Entre los métodos microbiológicos tenemos la fermentación en medio sólido usando *Aspergillus niger* (Brand y col., 2000). Por este método se reducen significativamente los niveles de cafeína, polifenoles y fibra de la pulpa, a la vez que su contenido de proteína aumenta de un 5% a un 15%. Algunos microorganismos como *Rhizopus arrizuz*, *Phanerochaete* reducen entre 65 - 92% la cafeína y entre 45 - 65% de taninos (Molina y col., 1990)

Otros usos de la PC incluyen la producción de composta, lombricomposta, aminoácidos, cultivo de hongos comestibles, producción de pectin-esterasa y poligalacturonasa, producción de biogás, bio-pesticidas y pro-bióticos (Martínez-Carrera y col., 2000). Algunos estudios (Kivaisi y Rubindamayugi, 1996) utilizan la pulpa de café para la producción de biogás y en consecuencia de electricidad (Tabla 2.3).

**Tabla 2.3.** Energía obtenida de la pulpa de café en Tanzania

	<b>Producción</b>	<b>Metano</b>	<b>Potencial de Electricidad</b>	<b>Sustituto de combustible fósil</b>
	<b>Ton/año</b>	<b>m<sup>3</sup> CH<sub>4</sub>/unidad</b>	<b>Millones kWh</b>	<b>Ton de diesel</b>
<i>Coffea robusta</i>	97200	650	190	53198
<i>Coffea arabica</i>	102000	730	223	62695

La PC es un material susceptible de ser aprovechado en la obtención de compuestos de alto valor agregado como el ácido clorogénico y los ácidos hidroxicinámicos que se encuentran en grandes cantidades en la PC. El ácido clorogénico es utilizado para la obtención de ácido quínico que puede transformarse a ácido shiquímico (Adachi y col., 2008) y ácido cafeico. También presenta propiedades antioxidantes y un efecto inhibidor en las enzimas responsables de liberar radicales libres e hidróperóxido, *in vivo* previene daños ocasionados por la oxidación relacionados con el cáncer y enfermedades cardiovasculares (Asther y col., 2005). Otros ácidos hidroxicinámicos son el ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico, los cuales se encuentran unidos por enlaces éster a los residuos de azúcar teniendo un papel importante en la estructura de la pared celular de las plantas. Los ácidos hidroxicinámicos presentan factores de protección a algunas enfermedades degenerativas crónicas como diabetes melitus y cáncer. Son de gran interés las enzimas que llevan a cabo la liberación y transformación de estos compuestos por su aplicación como potenciadores

nutracéuticos. Entre las diferentes carboxil ester hidrolasas tenemos a las lipasas, feruloil esterases, tanasas y clorogenato esterases, que pueden ser usadas para modificar la estructura de muchos compuestos fenólicos, incrementando su actividad biológica (Mateos y col., 2006).

### 2.1.3 Otros subproductos

El café despulpado produce subproductos tales como mucílago, pergamino, cascarilla y pulpa de café descrita en la sección anterior. El mucílago se encuentra entre la pulpa y la cáscara del grano de café, es una capa de 0.5 a 2 mm de espesor que está fuertemente adherida a la cáscara del grano de café, contiene agua, pectina, azúcares y ácidos orgánicos. Durante la maduración del fruto el pectato de calcio de la laminilla media y la protopectina de la pared celular son convertidos en pectinas. El pergamino del café está después de la capa de mucílago (Adachi y col., 2008). En las Tablas 2.4, 2.5 y 2.6 se presenta las composiciones químicas de la cascarilla, mucílago y pergamino.

**Tabla 2.4.** Composición química de la cascarilla en base seca

	<b>Cantidad (%)</b>	<b>Referencia</b>
Celulosa	13.2 – 27.6	Brand y col., 2000
Carbohidratos	57.8	Pandey y col., 2000
Fibra	31.86	Brand y col., 2000
Azúcares totales	26.5	Brand y col., 2000
Proteína	9.2 - 11.3	Pandey y col., 2000
Pectina	12.4	Pandey y col., 2000
Cafeína	1.1 - 1.3	Brand y col., 2000; Pandey y col., 2000
Taninos	4.5 - 9.3	Brand y col., 2000; Pandey y col., 2000

**Tabla 2.5.** Composición química del mucílago

	<b>Cantidad (%)</b>	<b>Referencia</b>
Pectina	35.8	Adams y Ghaly, 2007
Azúcares	45.8	Adams y Ghaly, 2007
Azúcares reductores	30	Carbonell y Vilanova, 1974
Azúcares no reductores	20	Carbonell y Vilanova, 1974
Cenizas	17	Carbonell y Vilanova, 1974

**Tabla 2.6.** Composición química del pergamino

	<b>Cantidad (%)</b>	<b>Referencia</b>
Carbono	66.4	Adams y Ghaly, 2007
Lignina	22.4	Adams y Ghaly, 2007

El mucílago ha sido usado en la producción de biogás o etanol, productos pécticos y como alimento para el ganado y peces (Adams y Ghaly, 2007). En Brasil la cascarilla es utilizada como fertilizante por su contenido de N y K, pero presenta algunos inconvenientes ya que presenta problemas de incorporación al suelo (Adams y Ghaly, 2007). La cascarilla presenta factores anti fisiológicos y anti nutricionales como la cafeína, taninos y otros polifenoles. Los taninos dan astringencia a los alimentos y forman complejos con las proteínas afectando la digestibilidad (Molina y col., 1990). En la Tabla 2.7 se muestran los microorganismos cultivados en pulpa y cascarilla de café así como sus usos.

**Tabla 2.7.** Microorganismos cultivados en pulpa y cascarilla de café

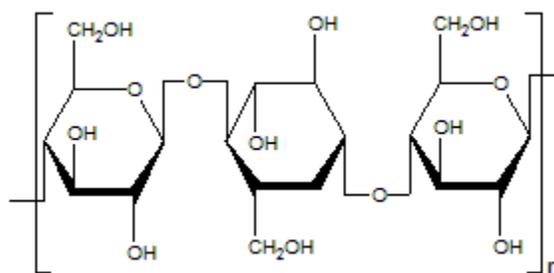
<b>Microorganismo</b>	<b>Uso</b>
<i>Aspergillus sp.</i>	Enriquecimiento de la proteína
<i>A. niger</i> (mutante)	Producción de Pectinasa
<i>A. niger</i> (pulpa de café)	Producción de Pectinasa
<i>A. niger</i>	Producción de Pectinasa
<i>A. niger</i> NRRL 2001	Ácido cítrico
<i>Ceratocysris fumbriana</i>	Aroma de Frutas
<i>F. Moniliforme</i>	Ácido Giberélico
<i>G. fujikuroi</i>	Ácido Giberélico
<i>L. edodes</i>	Producción de hongos
Metanogénesis de cultivos termofílicos	Producción de biogás
<i>P. tannophilus</i>	Compuestos aromáticos
<i>P. verrucosum</i>	Degradación de cafeína
<i>Pleurotus sp.</i>	Producción de hongos
<i>P. ostreatus</i>	Producción de hongos
<i>P. ostreatus</i> (pulpa de café)	Producción de hongos
<i>P. ostreatus</i>	Degradación de cafeína
<i>Penicillium sp.</i>	Producción de Pectinasa
<i>P. chrysosporium</i>	Detoxificación
<i>Rhizopus sp.</i>	Detoxificación
<i>Volvariella volvacea</i>	Producción de hongos

## 2.2 PARED CELULAR

La pared celular vegetal es una estructura rígida que le da soporte a los tejidos vegetales, tiene tres partes fundamentales: pared primaria, pared secundaria y laminilla media. La composición química depende si las plantas son monocotiledóneas o dicotiledóneas, y se compone principalmente de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina (Vries y Visser, 2001).

### 2.2.1 Celulosa

La celulosa es un  $\beta$ -(1,4)-glucano, representa la mayor fracción de los polisacáridos presentes en la pared celular (Figura 2.2). Es una larga cadena polimérica de peso molecular variable, su fórmula química es  $(C_6H_{12}O_6)_n$ . Es un polímero que está formado por cadenas de D-glucosa unidas por enlaces esteres  $\beta$ -(1,4). Este polímero forma largas y finas cadenas denominadas microfibrillas (armazón de la pared celular), las cuales se encuentran aglutinadas en una matriz constituida por pectina y hemicelulosa, dándole rigidez a la pared celular. Las microfibrillas son consideradas estructuras cristalinas formadas por 250 cadenas de glucosa unidas por hemicelulosas. La hemicelulosa y pectina se encuentran unidas por enlaces covalentes a la celulosa. La celulosa presenta múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de las cadenas de D-glucosa, lo que le confiere impermeabilidad al agua (Vries y Visser, 2001).



**Figura 2.2.** Estructura química de la celulosa

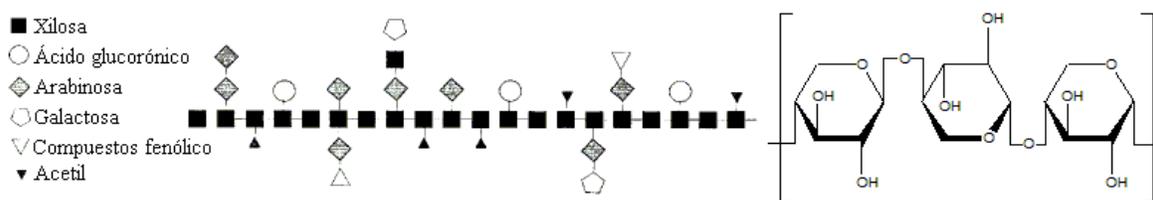
Entre los principales usos de la celulosa son como materia prima para el papel y para la elaboración de tejidos de fibras naturales. Se utiliza en la fabricación de explosivos

(nitrocelulosa), celuloide, seda artificial, barnices. También se usa como aislamiento térmico y acústico.

Los xiloglucanos están presentes en la pared celular de las dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas. Están formados por cadenas de D-glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -(1,4) que a su vez están sustituidos por residuos de D-xilosa. Los residuos de L-arabinosa y D-galactosa pueden estar unidos a los residuos de xilosa. Los xiloglucanos interactúan con las microfibrillas de la celulosa formando puentes de hidrógeno, estos contribuyen a la rigidez de la pared celular (Vries y Visser, 2001).

### 2.2.2 Hemicelulosa

La hemicelulosa es un heteropolisacárido, principalmente constituido de xilano que consiste de una cadena de D-xilosas unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4), que a su vez El xilano puede estar sustituido por diferentes grupos como L-arabinosa, D-galactosa, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido galacturónico. La L-arabinosa está unida a la cadena de xilano por enlaces ester  $\alpha$ -(1,2) o  $\alpha$ -(1,3) (Vries y Visser, 2001).

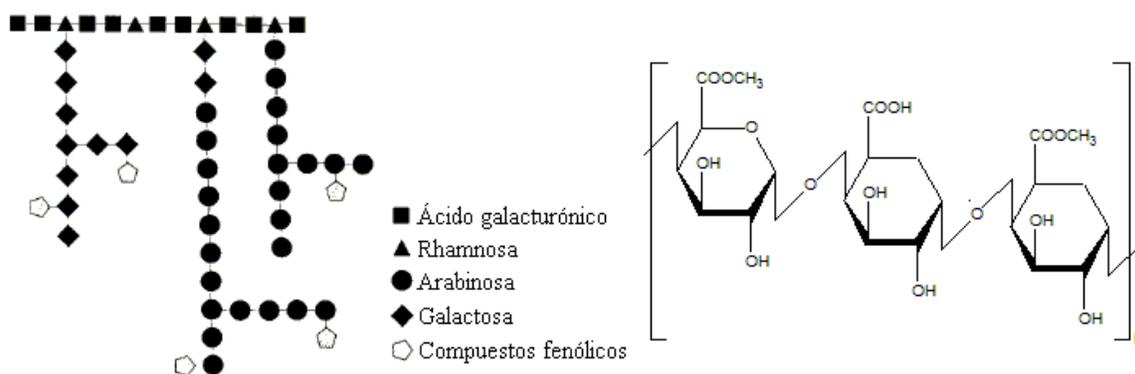


**Figura 2.3.** Estructura química y esquema del xilano

### 2.2.3 Pectina

La pectina tiene tres grupos principales: homogalacturonano, ramnogalacturonano I y II. El homogalacturonano está constituido por cadenas de ácido galacturónico unidos por enlaces  $\alpha$ -(1,4). Los grupos carboxilo del C6 pueden estar metilados. Los grupos hidroxilo, O2 u O3 pueden estar acetilados. Los grupos carboxilo de los homogalacturonanos pueden interactuar con el calcio, formando enlaces iónicos entre las cadenas poliméricas. El ramnogalacturonano I está formado por ácido galacturónico, ramnosa, arabinosa y galactosa. La ramnosa está unida por enlaces  $\alpha$ -(1,2). La ramnosa presenta ramificaciones

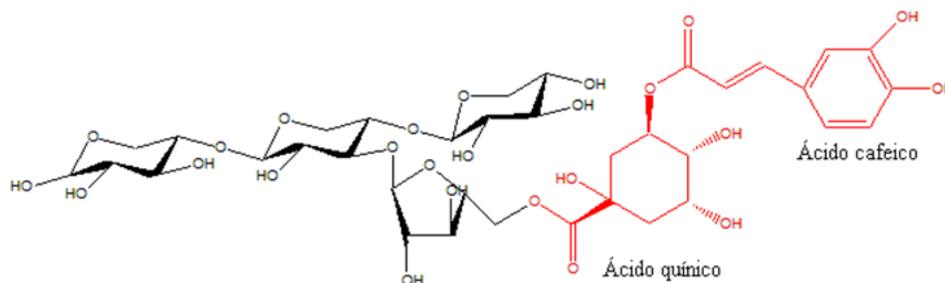
en C3 formadas por L-arabinosa unida por enlaces  $\alpha$ -(1,5) y  $\alpha$ -(1,3) y en C6 formadas por D-galactosa unida por enlaces  $\beta$ -(1,4). El ramnogalacturonano II presenta una estructura similar a la ramnogalacturonano I. La principal diferencia es que la ramnosa está ramificada en C3 y C5 por L-arabinosa y en C3 y C6 por D-galactosa. El ramnogalacturonano II puede formar dímeros mediante puentes de borato, con dos enlaces éster. La pectina que se encuentran en la pared primaria está más esterificada que la pectina de la lámina media (Vries y Visser, 2001).



**Figura 2.4.** Estructura química y esquema de la pectina

#### 2.2.4 El ácido clorogénico en la pared celular

El ácido clorogénico (ACI) está formado por una molécula de ácido quínico unida por un enlace éster a otra de ácido cafeico. Más del 70% del ácido clorogénico se encuentra unido a pectina (Clifford y Knight, 2004). Se cree que al igual que los ácidos hidroxycinámicos la molécula de ácido quínico del ACI se encuentra unida en la posición O-2 de la L-arabinosa y O-6 de la D-galactosa (Vries y Visser, 2001). Aproximadamente el 20–30% del ácido ferúlico presente en la pectina se encuentra unido mediante un enlace éster a la L-arabinosa, mientras el restante se encuentra unido a la D-galactosa. En el caso del ACI se desconoce la proporción de este ácido que se encuentra esterificado a la L-arabinosa y a la D-galactosa (Vries y Visser, 2001). En la Figura 2.5 se presenta un esquema de cómo se encuentra unido el ACI mediante un enlace éster a la pectina.



**Figura 2.5.** Esquema del ácido clorogénico esterificado a la pared celular

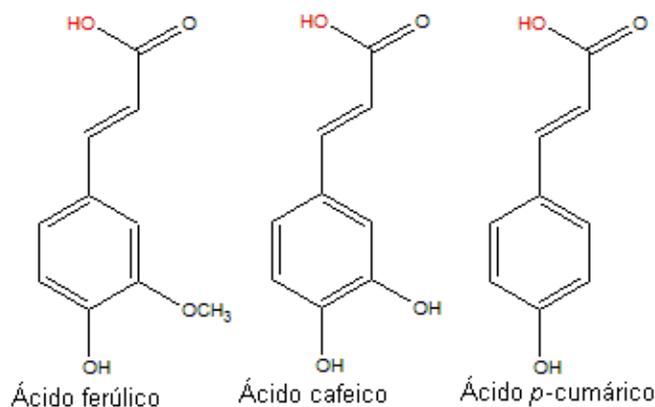
## 2.3 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos como su nombre lo indica se derivan de un compuesto aromático simple, fenol. Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas y están involucrados en los sistemas de protección contra la invasión de insectos, bacterias, hongos y virus (Friedman y Jurgens, 2000). Los compuestos fenólicos presentan uno o más anillos aromáticos y al menos un grupo hidroxilo (OH) como sustituyente en el (los) anillos aromáticos. Los compuestos que presentan varios grupos hidroxilo se les denomina polifenoles (Waterman y Mole, 1994). Estos compuestos tienen una fuerte actividad antioxidante y neutralizante de radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno (ROS), que son la causa de muchas enfermedades crónicas degenerativas (cardiovasculares, cáncer) (Kim y col., 2006). Estos compuestos se clasifican en base al número de anillos aromáticos presentes en su estructura y el número de átomos de carbono de la cadena sustituyente. (Waterman y Mole, 1994). Los compuestos fenólicos sintetizados por la ruta del ácido shiquímico como los ácidos hidroxicinámicos ( $C_6 - C_3$ ), al unirse por un enlace éster al ácido quínico dan lugar a la familia de los ácidos clorogénicos, que son el centro de atención en este estudio.

### 2.3.1 Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos (AH) derivan del ácido cinámico ( $C_6-C_3$ ), el cual se encuentra formado por un grupo acrílico ( $CH=CH-COOH$ ) unido a un anillo bencénico. Los más comunes son el ácido ferúlico (4-hidroxi-3-metoxicinámico), ácido cafeico (3,4-dihidroxicinámico), ácido *p*-cumárico (4-hidroxicinámico) y ácido sinápico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico) (Figura 2.6). El ácido ferúlico (AF), ácido cafeico (AC) y ácido *p*-

cumárico (ApC) presentan una buena actividad antioxidante. La presencia del grupo CH=CH-COOH en los AH les confiere una mayor capacidad antioxidante en comparación con el grupo COOH de los ácidos hidroxibenzoicos. El compuesto antioxidante se define como aquella molécula que a bajas concentraciones y ciertas condiciones previene la oxidación de un sustrato susceptible a ser oxidado. El AF presenta la mayor capacidad antioxidante en comparación a los tres AH hasta ahora identificados (Kim y col., 2006). En estudios *in vitro*, el AF y sus derivados tienen mayor capacidad antioxidante que las vitaminas E y C (Leighton y col., 1997). Anteriormente se sintetizaban compuestos con propiedades antioxidantes como el butilatodihidroxitolueno (BHT), butilatodihidroxianisol (BHA) y propil galato (PG) pero presentan efectos tóxicos y carcinógenos (Auerbach y Gray, 1999).



**Figura 2.6.** Ácidos hidroxicinámicos

El AF presenta actividad anti-microbiana por lo que es usado en lociones de baño y shampoos, en este tipo de productos se ha determinado que la combinación de 1000 ppm de ácido ferúlico con 1000 ppm de etil guaiacol o vinilguaiacol son efectivas en el control microbiano de bacterias como *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (Patente US 2003/0176508 A1).

Los AH son utilizados por la industria de cosmetología y alimentaria para la producción de fragancias. El AF es usado en la producción de aromas naturales como la vainillina (Asther y col., 2002). El AF se encuentra en mayor cantidad en el salvado de cereales y maíz. El maíz presenta hasta 1000 mg/kg de AF y el trigo 0.5 mg/kg. La pulpa de

remolacha azucarera presenta hasta un 1% en peso seco de AF (Allerdings y col., 2006; Asther y col., 2002). La mora azul tiene una concentración de AF de 500 – 550 mg/kg en materia seca, el kiwi tiene 150 – 250 mg/kg, las manzanas tienen 12.5 – 150 mg/kg, las peras tienen 3.75 – 150 mg/kg y el café tiene 88 – 473.5 mg/kg (Reyes-Cruz, 2004).

El AC es más abundante en frutas principalmente en las partes externas, representando entre un 75 y 100% del total de los ácidos hidroxicinámicos (Manach y col., 2004). El AC posee una fuerte capacidad antioxidante *in vitro* que involucra múltiples mecanismos de captación de radicales libres, efecto quelante sobre los iones metálicos y efecto inhibitorio sobre las enzimas responsables de la formación de peróxido de hidrógeno. El AC es usado como precursor en la fabricación de medicamentos anticarcinogénicos e inmunomoduladores (Asther y col., 2005). Kikuzaki y col. (2002) demostraron que el AC tiene mayor capacidad antioxidante que el 2,2-difenil-1-1-picrilhidrazil (DPPH),  $\alpha$ -tocoferol, ácido sinápico, hidroxitolueno butilado, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico. Tanaka y col. (1993) demostró que el AC inhibe la inducción-química de carcinogénesis en ratas (Couteau y col., 2001).

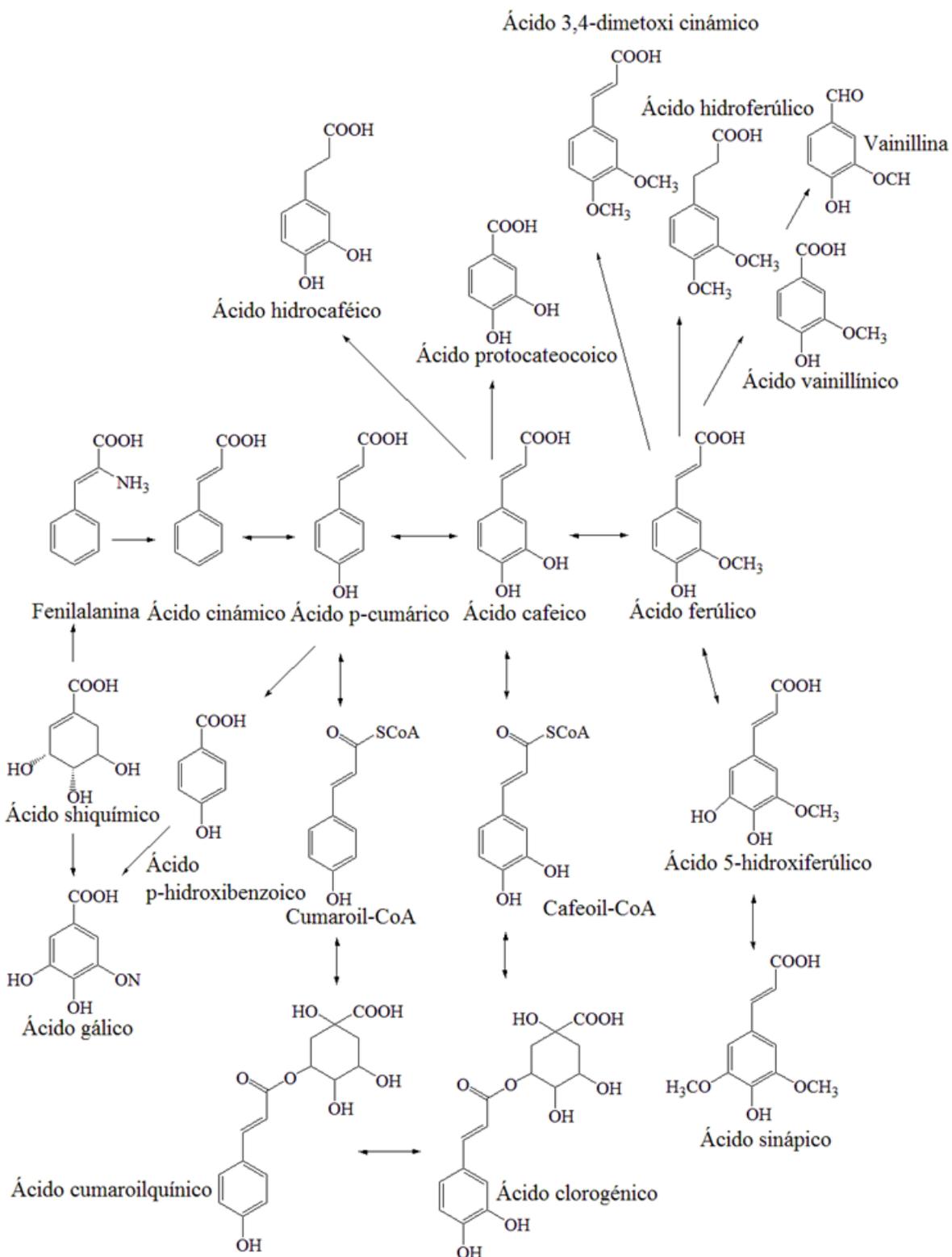
El ácido *p*-cumárico se encuentra en mayor proporción en el tallo de los cereales (Allerdings y col., 2006), en la espinaca, 200 mg/kg y en menor proporción en el salvado de la cebada, 30 mg/kg, este compuesto es usado en los filtros solares (Waterman y Mole, 1994). El ácido sinápico forma enlaces éster con azúcares, sus principales fuentes son los vegetales como la col, 350 mg/Kg; el brócoli, 100 mg/kg y en menor cantidad en jugos cítricos, 18 mg/kg (Waterman y Mole, 1994).

Se ha demostrado que durante la maduración de los frutos la concentración de los compuestos fenólicos incluyendo los ácidos hidroxicinámicos disminuye. En estudios con zapote negro se determinó que la concentración de compuestos fenólicos tuvo una disminución continua durante la maduración del fruto de hasta el 80% de los compuestos fenólicos. Esta disminución de la concentración de los compuestos fenólicos se debe a la disminución de la actividad fenilalanina amoniliasa que regula la síntesis de fenoles, esta enzima participa en la conversión de L-fenilalanina a ácido trans-cinámico que es el paso inicial de la ruta biosintética de fenilpropanoides como los ácidos hidroxicinámicos. Por

otro lado, tenemos que la enzima polifenoloxidasas está relacionada con el oscurecimiento de la pulpa de las frutas. Esta enzima incrementa su actividad durante la maduración, coincidiendo con la disminución en la concentración de los compuestos fenólicos. Además los compuestos fenólicos son un sustrato susceptible a ser oxidado por enzimas como polifenol oxidasas y peroxidasas (Arellano-Gómez y col., 2005).

Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran esterificados a la pared celular de las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. En las monocotiledóneas los ácidos hidroxicinámicos se encuentran unidos en la posición C-5 de los residuos de  $\alpha$ -L-arabinosil del arabinoxilano, mientras que en las dicotiledóneas está unido principalmente a la pectina, en la posición C-2 de los residuos de  $\alpha$ -L-arabinosa o en la posición C-6 de los residuos de D-galactopiranosas (Allerdings y col., 2004; Allerdings y col., 2006; Asther y col., 2002). Los ácidos hidroxicinámicos actúan como agentes entrecruzantes entre los polisacáridos y la lignina lo que modifica las propiedades de la pared celular de las plantas. El grado de entrecruzamiento de los ácidos hidroxicinámicos con los polisacáridos de la pectina tiene un papel importante en mantener la rigidez de los vegetales después de la cocción, además limita la degradación microbiana y enzimática de la pared celular (Allerdings y col., 2004; Allerdings y col., 2006). Este enlace puede ser hidrolizado usando alcali o ácido liberando los ácidos hidroxicinámicos esterificados (Kim y col., 2006).

Los ácidos hidroxicinámicos pueden formar dímeros lo que confiere mayor resistencia a la pared celular de las plantas. Los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y *p*-hidroxibenzaldehído inhiben el crecimiento de microorganismos del rumen (Fazary y col., 2007). Los ácidos fenólicos, ferúlico y *p*-cumárico forman principalmente enlaces éster con los monosacáridos presentes en la pared celular de las plantas, mientras que el ácido cafeico se encuentra en mayor proporción formando enlaces con el ácido quínico, formando el ACI, el cual se encuentra en mayor proporción en el café, sidra y en frutas como manzanas y arándanos (Clifford, 1999). Los AH pueden ser biotransformados por diferentes complejos enzimáticos provenientes de microorganismos, los más estudiados son los provenientes de las cepas de *Aspergillus*. En la Figura 2.7 se presenta de manera esquemática la transformación de los AH por cepas de *A. niger* (Baqueiro-Peña y col., 2010; Seshime y col., 2005).

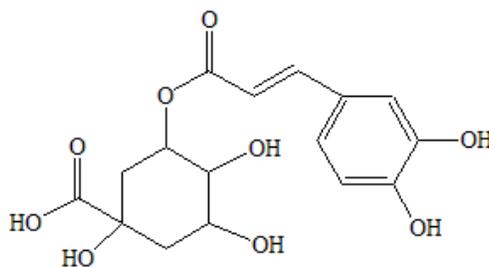


**Figura 2.7.** Representación esquemática de la transformación de los AH

Una manera de obtener ácidos hidroxycinámicos es mediante la hidrólisis enzimática de la pared celular por medio de la acción de celulasas, xilanasas, glicosidasas, amilasas y pectinasas. Las cuales en conjunto con las enzimas feruloil y cinamoil esterasas permiten la liberación de los ácidos hidroxycinámicos a partir de productos y subproductos agrícolas como la pulpa de café (Faulds y Williamson, 1991; Kroon y Williamson, 1999).

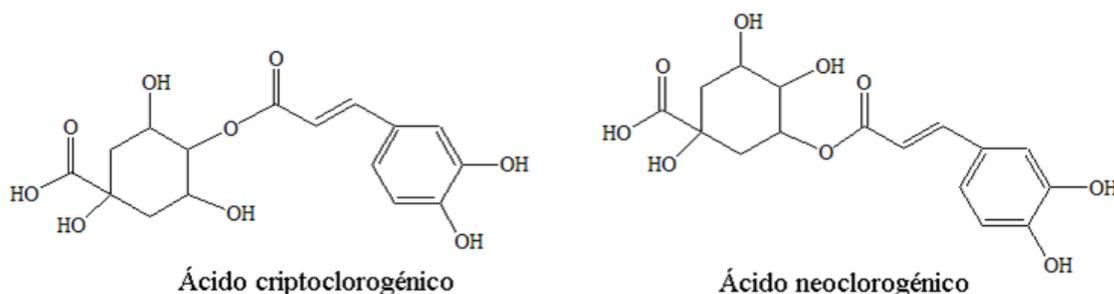
### 2.3.2 Ácido clorogénico

Los ácidos clorogénicos son compuestos fenólicos formados por una molécula de ácido quínico unida por un enlace éster a los ácidos hidroxycinámicos (Figura 2.8). Este compuesto fue aislado por primera vez por Gorter en 1909. En las plantas se pueden presentar dímeros, pertenecientes al grupo de los ácidos clorogénicos el más común es el ácido 1,5-dicafeoilquínico seguido del ácido 1,3-dicafeoilquínico y en menor proporción los ácidos 3,4-dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico y 4,5-dicafeoilquínico (Clifford, 1985). El ACI es considerado un inhibidor de la carcinogénesis. Se ha demostrado que previene el estrés oxidativo inducido por paraquat (compuesto venenoso de dipiridilio) en ratas. El estrés oxidativo es la alteración del equilibrio pro-oxidante – anti-oxidante a favor del primero, que conduce a daños potenciales. Una sustancia pro-oxidante se define como aquella sustancia que produce subproductos del oxígeno del metabolismo que pueden dañar las células. Los indicadores del estrés oxidativo incluyen bases de ADN dañadas, productos de oxidación de las proteínas y de peroxidación de lípidos (2). Se ha descrito el uso de mezclas de AC con ACI como alternativa al uso de antioxidantes sintéticos (Gotteland y de Pablo, 2007). Se sabe también que el ACI previene diferentes tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares.



**Figura 2.8.** Estructura química del ácido clorogénico

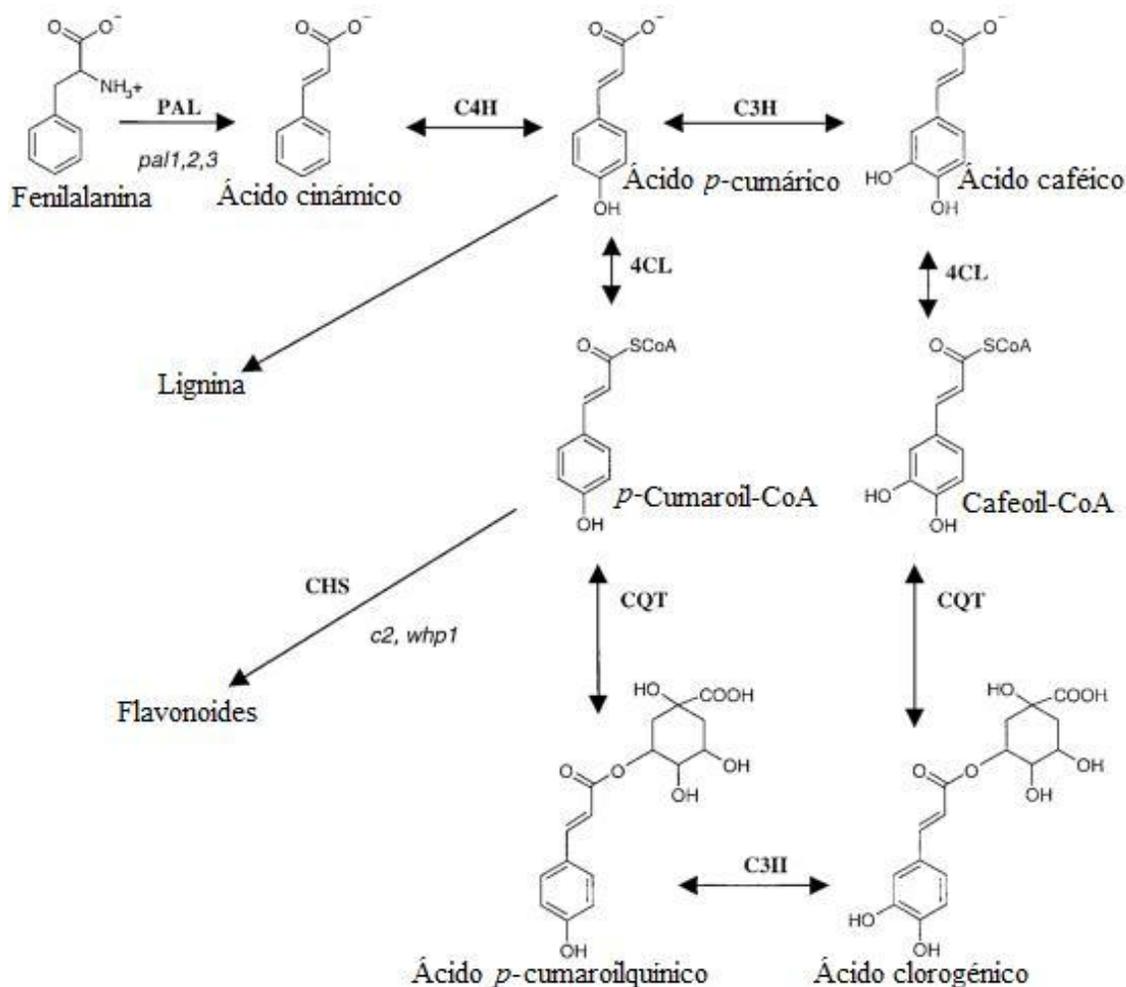
En las plantas los grupos -OH del ácido quínico pueden formar enlaces éster con el ácido cafeico dando lugar a la formación no sólo del ACI (ácido 5-cafeoilquínico) si no también a la formación de isómeros como: el ácido 4-cafeoilquínico (criptoclorogénico), ácido 3-cafeoilquínico (neoclorogénico) y 1-cafeoilquínico (Figura 2.9, Wang y col., 2009).



**Figura 2.9.** Estructuras de las diferentes formas del ACI

El ACI es producto de la ruta de los fenilpropanoides (Figura 2.10). En la primera etapa de la ruta, la fenilalanina sufre una desaminación por la fenilalanina amonía liasa (PAL) produciendo el cinamato, para que éste sea transformado a ACI se requiere de cuatro enzimas las cuales hacen 2 hidroxilaciones del anillo y una conjugación de la actividad hidroxinamato y quinato: cinamato-4-hidroxilasa (C4H), 4-cumaroil-CoA ligasa (4CL), cumaroil-CoA: quinato hidroxinamoiltransferasa (CQT) y cumarato/cumaroilquinato-3-hidroxilasa (C3H) (Bushman y col., 2002).

En la FMS y en medio sumergido altas concentraciones de ACI y otros compuestos fenólicos inhiben el crecimiento microbiano (Adachi y col., 2008). El ACI puede ser hidrolizado por la enzima clorogenato esterasa (CIE) y por otro tipos de esterases producidas durante el proceso de FMS (Asther y col., 2005).



**Figura 2.10.** Ruta metabólica del ácido clorogénico. PAL: fenilalanina amonía liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; C3H: cumarato/cumaroilquinato-3-hidroxilasa; 4CL: 4-cumaroil-CoA ligasa; CQT: cumaroil-CoA: quinato hidroxinamoiltransferasa

### 2.3.2.1 Fuentes de ácido clorogénico

En diversos estudios se ha observado que la cantidad de ACI aumenta durante el desarrollo del fruto y empieza a disminuir durante las etapas de maduración del fruto (Mikulic y col., 2003). En las plantas del género *Coffea* y *Solanum* se han encontrado grandes cantidades de ACI por lo que se ha determinado que el ACI se presenta en mayor proporción en las plantas dicotiledóneas que en las monocotiledóneas (Abdullah y col., 2008). La papa fresca *Solanum tuberosum* L. presenta de 100 a 190 mg/kg de ACI, la pulpa

de papa tiene de 30 a 900 mg/kg de ACI y la piel tiene de 1000 a 4000 mg/kg de ACI. Estas concentraciones varían con la especie y el cultivo de la papa (Ieri y col., 2011).

Más de 100 diferentes tipos de ácidos fenólicos han sido aislados del café verde y tostado. De los ácidos fenólicos presentes en mayor proporción en el café verde son los ACI, de los cuales el más abundante es el ácido 5-*O*-cafeoilquinico, un éster formado entre el ácido quínico y el ácido cafeico. El café verde presenta 7% de ACI, durante el proceso de tostado el ACI es degradado (en un 30 a 50%) a ácido cafeico y ácido quínico (Gotteland y de Pablo, 2007; Nunes y col., 2010).

El café representa una de las fuentes más ricas de ACI, a pesar de presentar actividad antioxidante *in vitro*, aún no es claro cuanta actividad antioxidante pueda tener *in vivo*. La cantidad de ACI varía con el grado de maduración, la especie y otros factores como la altura a nivel del mar del cultivo. Se han identificado 11 ácidos clorogénicos en el café Robusta (Gotteland y de Pablo, 2007). El ACI es uno de los compuestos más abundantes en la pulpa de café, Labat y col. (2000) reportan que hay entre 3600 a 7000 mg de ACI/kg de pulpa de café.

Las fuentes comerciales en China de obtención del ACI son las plantas como: *Lonicera japonica* y *Eucommia ulmoides*. La extracción del ACI de estas fuentes resulta costosa económicamente (Chen y col., 2007)

### **2.3.2.2 Usos y comercialización**

En la industria alimentaría el ACI es utilizado como un modificador del sabor porque tiene un efecto edulcorante en los alimentos. Es usado en la protección de los dientes por que forma una película protectora contra las bacterias (Solis y Herrera, 2005). El ACI inhibe la actividad de la glucosa-6-fosfatasa hepática, esta enzima interviene en el último paso en la producción de la glucosa a partir de las reservas de glucógeno que se encuentran en el hígado (gluconeogénesis), por lo que el ACI es utilizado como principio activo en medicamentos que son recetados a pacientes con diabetes tipo 2, también presenta un efecto hipocolesterolémico (Schwab y col., 2001).

El ACI presenta acción anti-viral, actúa como inhibidor específico de la enzima VIH-1 integrasa, hecho por el que los ácidos clorogénicos se constituyen como compuestos promisorios para el desarrollo de nuevos agentes anti-VIH (Palacios y col., 1999). En China se produce el medicamento Daqingye que presenta al ACI como principio activo, es usado en el tratamiento de diversas enfermedades virales y contra inflamaciones (Yuan y col., 2006).

El ACI se comercializa bajo el nombre de Svetol en Noruega como un aditivo alimentario utilizado en el café, goma de mascar, mentas y para promover la reducción de peso. El ACI está actualmente disponible en el mercado internacional como productos con varios grados de pureza: HPLC, analítico, alimenticio, farmacéutico y a granel. Así mismo, se comercializa como aditivo alimentario para ser incorporado a tratamientos para reducir el peso corporal. China es el principal exportador de ACI, se extrae de vegetales del género *Eucommia* cultivados para tal fin (Kweon y col., 2001).

El precio en el mercado internacional para el 2012 del ACI varía de \$900 a \$20 mil pesos MN por kg de acuerdo a su grado de pureza, método de obtención y fuente. El ACI grado HPLC sintetizado por vía química que comercializa Sigma-Aldrich y Fluka presenta un precio de \$1524 pesos MN por 10 g (152 mil pesos por kg).

Las comercializadoras de ACI de China presentan diversos precios. El precio de los productos grado alimenticio y farmacéutico de la familia de los ácidos clorogénicos en su composición con una pureza del 5 - 98% varía entre \$900 – \$3000/kg. Estos productos son obtenidos por extracciones con disolventes orgánicos de vegetales del género *Eucommia*, madreleña y granos de café. Mientras que el precio de los productos que presentan únicamente el ACI en su composición con una pureza del 25% - 99% está entre \$2 mil - \$18 mil/kg. Estos productos son obtenidos mediante extracciones con disolventes orgánicos del fruto y grano de café verde, vegetales del género *Eucommia ulmoides* y flores de honeysuckle (3).

## 2.4 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO

### 2.4.1 Métodos químicos

El ACI es extraído comúnmente por medio de solventes orgánicos como el cloroformo y diclorometano, que son peligrosos y nocivos para la salud humana y el medio ambiente. La extracción con etanol es el método más común para realizar la extracción del ACI. Se tienen hasta 3.35 mg de ACI/ml de solvente con etanol por 2 horas a 78°C (Chen y col., 2007). Las extracciones con solventes son poco selectivas lo que ocasiona un alto costo en el proceso de purificación de los compuestos extraídos.

El ACI también es extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico. La tecnología de fluidos supercríticos se dirige a la obtención de extractos herbales a partir de plantas aromáticas, el mejoramiento de propiedades en alimentos, microencapsulación, descontaminación de aguas residuales entre otras aplicaciones. Los fluidos supercríticos son aquellos fluidos que son llevados por arriba de las condiciones críticas de temperatura y presión de un fluido, exhiben simultáneas propiedades de líquidos y gases. Las ventajas que presenta este tipo de proceso son: se puede ajustar la selectividad y rendimiento del disolvente a partir modificar la temperatura y la presión, presenta altos coeficientes de difusión y viscosidades bajas en comparación con otros líquidos, rápida difusión del CO<sub>2</sub> a través de fases condensadas por ejemplo polímeros, recuperación del disolvente. Tiene la desventaja de que la solubilidad decrece cuando incrementa el número de grupos funcionales polares y es poco selectiva (Azevedo y col., 2008; Perry, 1999).

La tecnología de fluidos supercríticos es usada en la extracción de aromas, decafeinización del café y té, extracción de la nicotina del tabaco, extracción de compuestos orgánicos de aguas residuales. Los dos fluidos más utilizados son el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>O. El CO<sub>2</sub> es un gas inocuo, no tóxico, no flamable. La condiciones críticas de temperatura, presión y densidad para el CO<sub>2</sub> son 31.1°C, 73.82 bar y 464 kg/m<sup>3</sup>, respectivamente (Perry, 1999).

### **2.4.2 Métodos Biológicos**

Por otro lado, la extracción enzimática se realiza por la hidrólisis enzimática de la pared celular de las plantas por medio de esterasas, pectinasas y xilanasas. La extracción enzimática resulta selectiva, económica y se permite la obtención de un producto natural (Faulds y Williamson, 1991; Kroon y Williamson, 1999). Sin embargo tiene la desventaja de la hidrólisis del ACI por esterasas como la clorogenato esterasa ocasionando pérdidas en la extracción del mismo (Adachi y col., 2008).

## **2.5 BIOTRANSFORMACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO**

El ACI está formado por una molécula de ácido cafeico (AC) y otra de ácido quínico (AQ) unidas entre sí por un enlace éster. El ACI puede ser biotransformado por hongos y bacterias. La enzima clorogenato esterasa de la cual hablaremos más adelante es la responsable de romper el enlace éster entre el AC y el AQ aumentando la biodisponibilidad de estos compuestos facilitando su biotransformación en otros compuestos (Adachi y col., 2008).

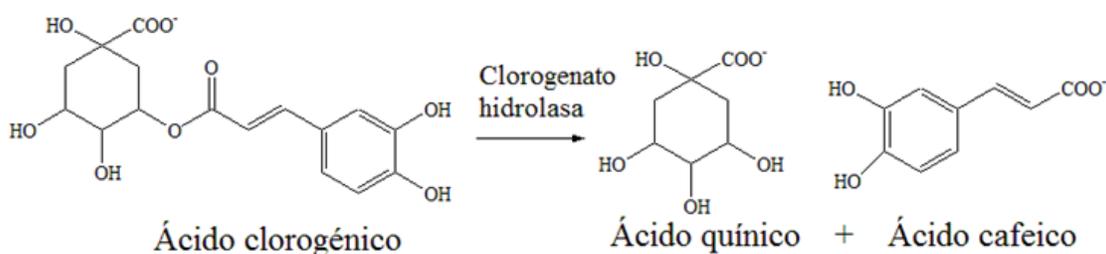
Adachi y col. (2008) reportan la biotransformación del AQ por dos diferentes sistemas enzimáticos de bacterias ácido-acéticas. En una primera etapa se hidroliza el ACI con ayuda de la enzima clorogenato esterasa (CIE). El AQ producto de la hidrólisis es biotransformado hasta ácido shiquímico por la acción de diferentes enzimas: quinato deshidrogenasa (QDH), 3-dehidroquinato deshidratasa (DQD) y shiquimato deshidrogenasa (SQDH) como se muestra en la Figura 2.11 (Adachi y col., 2008).

En varias publicaciones la enzima CIE ha sido empleada para la obtención del AC que es un antioxidante, sin embargo no se ha puesto mucha atención al AQ esto se debe a que el uso del AQ es más limitado que el del AC. El AQ es empleado para la producción de ácido shiquímico (Adachi y col., 2008).

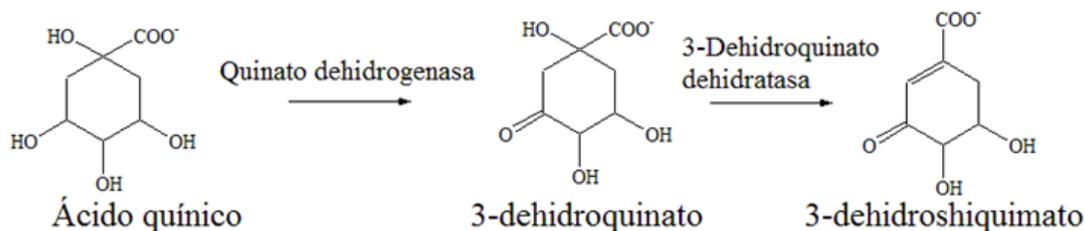
El ácido shiquímico es empleado como precursor de la síntesis de Oseltamivir que es un profármaco antiviral selectivo contra el virus de la influenza. Lo produce Hoffmann-La Roche en el medicamento con el nombre Tamiflu® (Adachi y col., 2008).

El AC proveniente de la hidrólisis del ACI es precursor del catecol, 4-metilcatecol, 4-etilcatecol y 4-vinilcatecol. El AQ puede ser transformado en catecol, pirogalol e hidroxihidroquinona (Nunes y col., 2000).

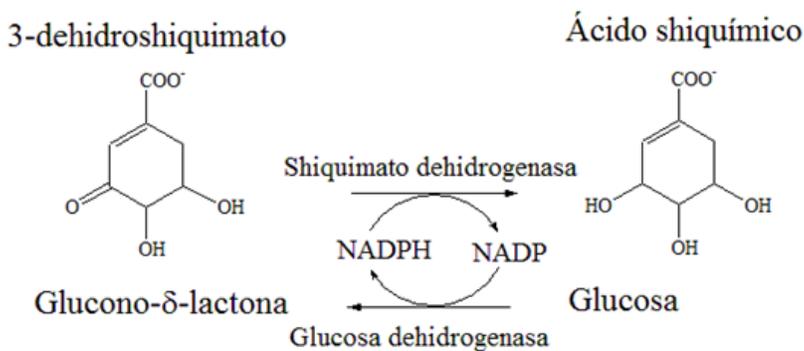
### (1) Hidrólisis del ácido clorogénico



### (2) Formación del ácido dehidroshiquímico a partir del ácido quínico por enzimas unidas a la membrana

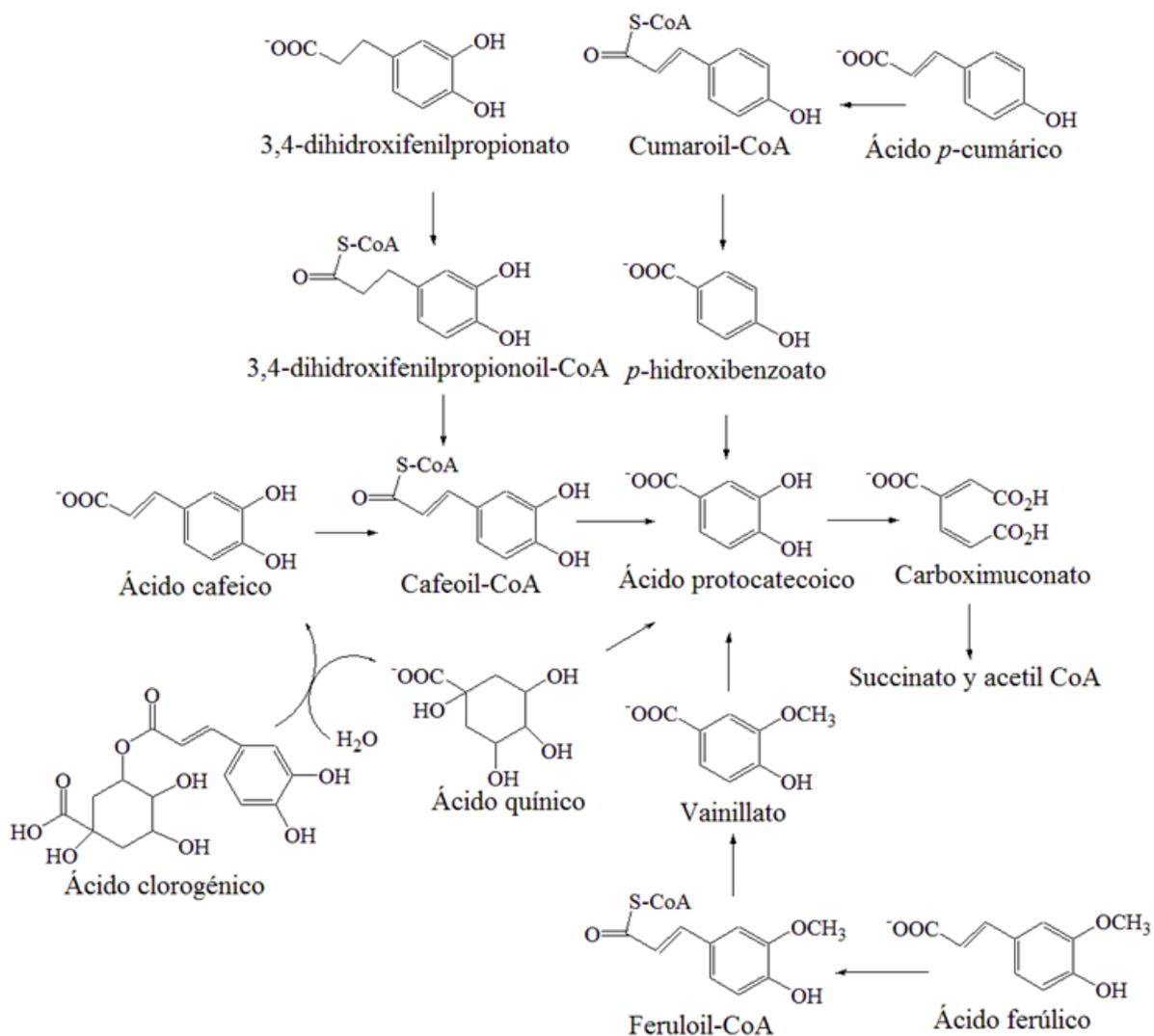


### (3) Formación de ácido shiquímico con enzimas citoplasmáticas



**Figura 2.11.** Biotransformación del ácido clorogénico por bacterias ácido-acéticas

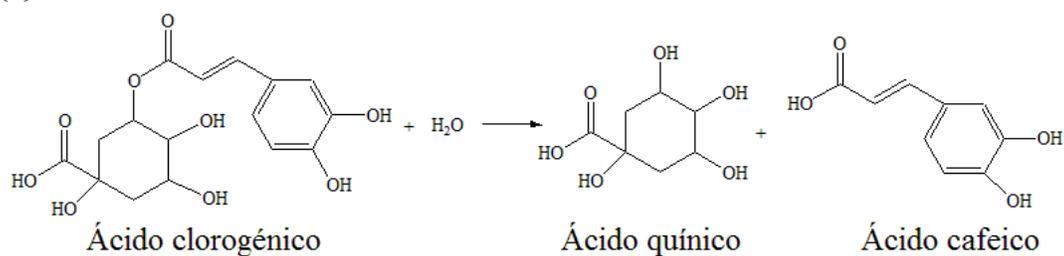
En la Figura 2.12 se tiene otro ejemplo de biotransformación del ACI a ácido protocateico (AP) por *Acinetobacter* sp. ADP1 (Smith y col., 2003).



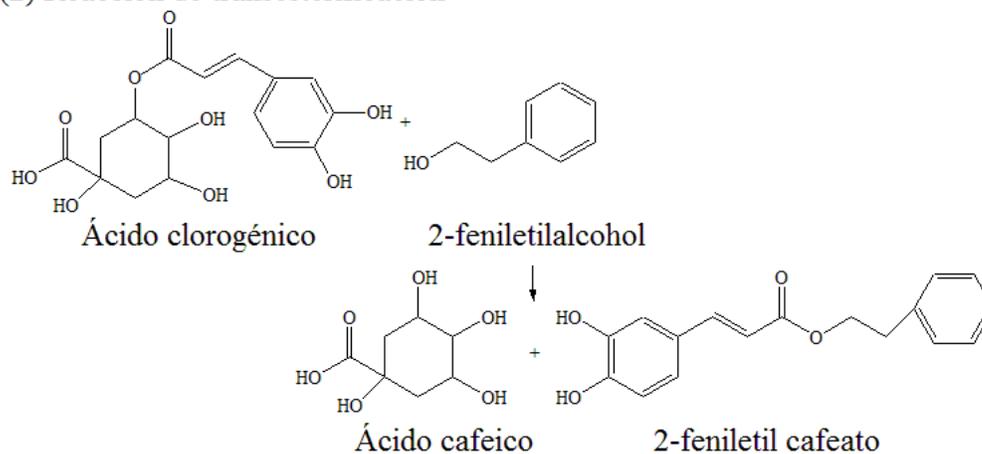
**Figura 2.12.** Biotransformación del ácido clorogénico por *Acinetobacter* sp. ADP1

Hernández y col. (2009) reportan que la esterificación del ACI con compuestos como pentanol, heptanol y geraniol aumenta la capacidad antioxidante del ACI, mejorando su bioactividad y biodisponibilidad. La esterificación del ACI se puede llevar a cabo con la lipasa B de *Candida antártica* en condiciones de CO<sub>2</sub> supercrítico con *t*-butanol.

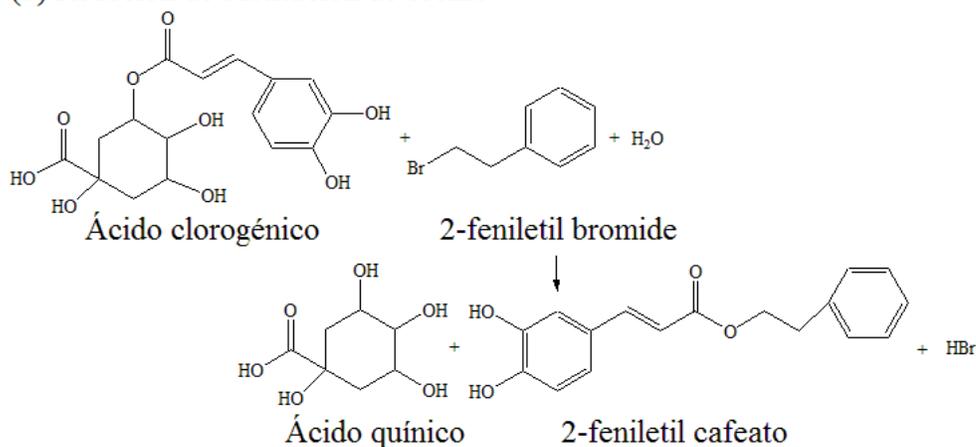
## (1) Reacción de hidrólisis



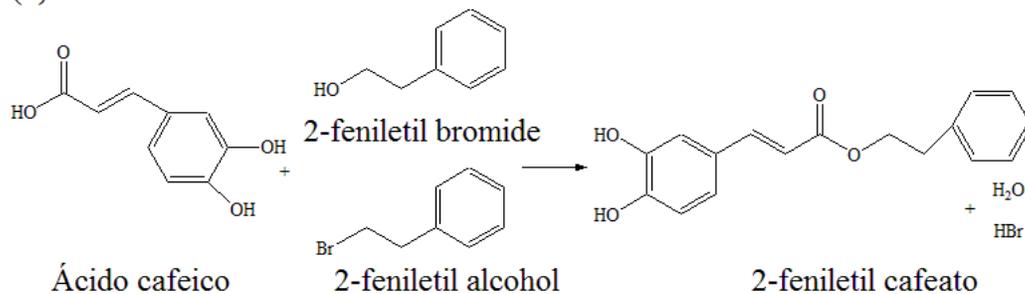
## (2) Reacción de transesterificación



## (3) Reacción de sustitución de bromo



## (4) Reacción de condensación


**Figura 2.13.** Diferentes mecanismos de reacción que presenta la CIE

El ACI puede ser transformado en derivados y otros productos de alto valor agregado como el metil cafeato, etil cafeato y 2-feniletíl cafeato, este último es un ingrediente derivado del propóleo. Estos esterés presentan actividades biológicas como antioxidantes, antifúngica, inhibitoria de la producción de plaquetas, antiviral, y efectos anticarcinogénicos. En condiciones no acuosas la CIE puede catalizar la reacción de transesterificación para producir estos esterés. Otros derivados del ACI producidos por la CIE son el cafeoil y *p*-cumaroil tartárico, etil y benzil cinamato (Kishimoto y col., 2005). La CIE puede transformar el ACI a 2-feniletíl cafeato por varios mecanismos de reacción (Figura 2.13).

## **2.6 FERMENTACIÓN EN MEDIO SÓLIDO**

Numerosos reportes describen las aplicaciones y ventajas de usar la fermentación en medio sólido (FMS) en bio-procesos y en la producción de diferentes productos con valor agregado. Las principales ventajas de la fermentación en medio sólido son sus bajos requerimientos de energía, ausencia de maquinaria compleja y ausencia de control sofisticado del sistema. La principal desventaja en el escalamiento de este tipo de procesos es la dificultad para remover el calor generado por el metabolismo microbiano en los cultivos. La FMS ha tenido varias aplicaciones, como la bio-remediación y detoxificación de residuos agro-industriales, producción de compuestos bio-activos, enzimas y fragancias (Asther y col., 2002).

La FMS presenta un gran potencial para la producción de enzimas. Esto es de interés debido a que se puede usar el material final fermentado crudo como biocatalizador o fuente de enzimas (Pandey, 2003).

### **2.6.1 Definición**

La FMS puede definirse como cualquier proceso con actividad microbiana que permite el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos húmedos en ausencia de escurrimientos de agua (Asther y col., 2002; Figueroa-Montero y col., 2011a).

La FMS también se define como una técnica de cultivo de microorganismos sobre la superficie de partículas sólidas humedecidas a un grado tal que permita el crecimiento de los microorganismos pero que no exceda el nivel máximo de retención de agua de la matriz sólida, de manera que se forme una fase gaseosa en los espacios entre las partículas sólidas (Minjares y col., 1997).

La FMS es un proceso microbiano que se desarrolla en la superficie y en el interior de una matriz sólida (Lonsane y col., 1985), que tiene la propiedad de absorber o contener agua, con o sin nutrientes solubles. Los materiales sólidos pueden ser o no biodegradables, por ejemplo, almidón y celulosa son soportes degradables, mientras que el poliuretano es un soporte inerte. El crecimiento de los microorganismos en FMS requiere que éstos crezcan sobre un soporte que difunda nutrientes, bajo una atmósfera gaseosa (Viniegra-González y col., 2003).

La FMS tiene un gran potencial para la producción de enzimas, principalmente en aquellos procesos donde el producto crudo de la fermentación puede ser usado directamente como fuente de enzimas o alimento. Los principales factores que afectan la síntesis enzimática y el crecimiento de los microorganismos en FMS incluyen la selección adecuada del sustrato o soporte inerte, tamaño de partícula, espacio inter-particular y área superficial, contenido de humedad y actividad de agua ( $a_w$ ) del sustrato, humedad relativa de la atmósfera gaseosa, tipo y tamaño de inóculo, control de la temperatura durante la fermentación y remoción del calor metabólico, tiempo de cultivo, como control en la uniformidad de las condiciones ambientales durante la fermentación, velocidad de consumo de oxígeno y velocidad de liberación de CO<sub>2</sub> (Pandey y col., 1999).

### **2.6.2 Soportes empleados en la fermentación en medio sólido**

Los soportes empleados en FMS son insolubles en agua y actúan como fuente de carbono, nitrógeno y de minerales (Pandey y col., 1999). Los soportes tienen la capacidad de absorber el agua necesaria para las actividades metabólicas. El tipo de soporte y el pretratamiento del mismo influyen considerablemente sobre la FMS (Pandey y col., 1999; Hoogschagen y col., 2001). Los soportes empleados en FMS se pueden clasificar en dos grandes categorías: 1) Soportes de materiales orgánicos que son moléculas poliméricas

insolubles o parcialmente solubles en agua, y que sirven al mismo tiempo como soporte y sustrato (soporte-sustrato). Son generalmente productos agro-industriales, 2) Soportes de materiales inertes, su función es sólo como soporte (soporte inerte) y deben de impregnarse con medios de cultivo (Durand y col., 1996).

Los soportes sólidos que se utilizan en la fermentación en medio sólido pueden ser usados solo como soportes o como soporte y fuente de carbono. El uso de productos naturales como fuente de energía y soporte como son los residuos agro-industriales ofrece ventajas por ser sustratos baratos y presentan el interés de aprovechar un residuo para obtener productos de alto valor agregado. Numerosos subproductos generados por las agroindustrias han sido utilizados como sustrato tal es el caso del bagazo de caña, salvado y paja de trigo y arroz, pulpa de remolacha azucarera y pulpa de café (Asther y col., 2002).

Los residuos agro-industriales son los soportes-sustratos más utilizados en FMS (Pandey y col., 1999). La selección del soporte es crítica y repercute sobre el éxito de la FMS, esta selección involucra la búsqueda de materiales agrícolas adecuados para el crecimiento microbiano y producción de enzimas (Pandey y col., 1999).

Este tipo de sustratos sólidos son procesados de manera parcial y son estructural y nutricionalmente complejos, con lo que la caracterización del soporte es prácticamente imposible y también puede interferir con la reproducibilidad del proceso. La presencia de mezclas de componentes de alto y bajo peso molecular, puede ocasionar patrones complejos de inducción, represión e inhibición en la regulación del metabolismo microbiano.

Los residuos agroindustriales que serán utilizados en la realización de este trabajo fueron la pulpa de café, orujo de olivo y bagazo de caña. A continuación se describe la composición y características de estos soporte/sustrato.

El bagazo de caña es el residuo de materia que se obtiene después de extraer el jugo de la caña de azúcar, ha sido utilizado para la producción de enzimas como celulasas, que son ampliamente usadas en los jugos de frutas y extracción de aceites (Pandey y col., 2000). La composición química del bagazo de caña es la siguiente: 50% de celulosa y 25%

de hemicelulosa y lignina. Regularmente el bagazo de caña presenta 50% de  $\alpha$ -celulosa, 30% de pentosas y 2.4% de cenizas (Pandey y col., 2000).

Aiello y col. (1996) usa *Trichiderma reesei* QM-9414 para producir celulasas y biomasa a partir del bagazo de caña. Roussos y col. (1991) utiliza una mezcla de bagazo de caña con salvado de trigo (4:1) para la producción de celulasas. Las xilanasas son otro tipo de enzimas que han sido producidas por FMS usando bagazo de caña (Pandey y col., 2000).

Por su parte, el orujo de olivo es el principal desecho generado en la elaboración del aceite de oliva, presenta residuos de aceite que no pueden ser extraídos. La composición química del orujo depende de la variedad del olivo, el grado de maduración y el sistema empleado en la extracción del aceite de olivo. En la Tabla 2.8 se presenta la composición química del orujo de olivo que resulta de los diferentes procesos de obtención del aceite de olivo (Lakhtar, 2009).

**Tabla 2.8.** Composición química del orujo de olivo

Tipo	Materia seca	Nitrógeno total	Celulosa	Materia grasa
Orujo crudo	75-80%	5-10%	35-50%	8-15%
Orujo graso sin hueso	80-95%	9-12%	20-30%	15-30%
Orujo prensado	85-90%	8-10%	35-40%	4-6%

### 2.6.3 Condiciones ambientales que afectan la producción de enzimas

La producción de enzimas por fermentación en medio sólido presenta algunas ventajas que incluyen los altos títulos de enzima y los altos niveles de producción, bajos niveles de represión catabólica y un incremento en la estabilidad de las enzimas (Asther y col., 2002).

Un gran número de enzimas son producidas por microorganismos por FMS como: celulasas, xilanasas, pectinasas, etc. (Pandey, 2003). Las condiciones ambientales como: temperatura, pH, actividad de agua, niveles de oxígeno y concentración de nutrientes y productos, afectan el crecimiento de los microorganismos y la producción de enzimas.

El bajo contenido de humedad en la FMS permite que el volumen por masa de sustrato sea menor que en los cultivos sumergidos por lo que simplifica la recuperación del producto (Moo-Young y col., 1983).

#### Contenido de humedad y actividad de agua ( $a_w$ )

La presencia de agua en FMS es importante para que las células realicen sus funciones metabólicas. Las células contienen de 70% a 80% de agua. El agua presente en la FMS está en un complejo dentro de la matriz sólida (Cannel y Moo-Young, 1980) en forma de una delgada capa, ya sea absorbida sobre la superficie de las partículas o enlazada dentro de las regiones capilares de las partículas (Mudgett, 1986). El agua libre en la FMS se presenta una vez que se excedió la capacidad de saturación de la matriz sólida (Laukevics y col., 1984).

Los niveles de humedad en FMS varían entre 30% y 85% (Laukevics y col., 1984; Oriol y col., 1988; Reid 1989) tienen un efecto sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos. Altos niveles de humedad en la FMS ocasionan problemas como: 1) Las partículas del sustrato se adhieren entre sí o a las paredes del recipiente donde se esté realizando la FMS (Grant y col., 1978), 2) Los espacios entre las partículas son llenados con agua lo cual limita el intercambio de gases y ocasiona que el sustrato se vuelva más vulnerable a la contaminación bacteriana (Moo-Young y col., 1983; Baldensperger y col., 1985; Lonsane y col., 1985; Considine y col., 1987; Han y col., 1987). Por otro lado, bajos niveles de humedad, reducen la actividad microbiana, la estabilidad enzimática, el hinchamiento del sustrato y la difusión de los nutrientes (Moo-Young y col., 1983; Lonsane y col., 1985). La actividad enzimática es inhibida generalmente en un menor grado que el crecimiento microbiano por bajos niveles de humedad (Acker, 1969).

La mejor forma para medir la disponibilidad de agua, es mediante la actividad de agua. La actividad de agua puede disminuir o aumentar dependiendo la concentración de solutos que se encuentren en el medio de cultivo. La actividad de agua se define como la razón entre la presión de vapor del agua en el sustrato ( $p$ ) con la presión de vapor del agua pura ( $p_0$ ) a la misma temperatura (Scott, 1957), es decir,  $a_w = p/p_0$ . Este concepto está

relacionado con otros parámetros tales como la humedad relativa ( $HR (\%) = 100 \times a_w$ ) y el potencial de agua ( $\psi = RT/V \ln a_w$ ; donde  $R$  es la constante de los gases ideales,  $T$  es la temperatura absoluta y  $V$  es el volumen molar del agua) (Griffin, 1981).

Los valores de contenido de humedad varían en el rango de 22.4 a 75% en cultivos sólidos y dependen de la naturaleza del producto, el sustrato y la elección de microorganismo. El nivel de humedad es afectado por varios parámetros ambientales como el grado de agitación (Deschamps y col., 1985) y la temperatura (Silman y col., 1979; Kim y col., 1985). Además, las condiciones de contenido de humedad para la formación de producto pueden diferir de aquellas del crecimiento (Grajek y Gervais, 1987). La  $a_w$  podría ser ajustada inicialmente para un crecimiento óptimo y más tarde ser cambiada para optimizar la formación de producto (Narahara y col., 1982).

La estabilidad de las enzimas es afectada por la  $a_w$ . Bajo condiciones de agitación, alta concentración de azúcar pero no de NaCl conducen a la pérdida de actividad de la pectato liasa. La estabilidad de las enzimas producidas por procesos de FMS a diferentes niveles de humedad no ha sido muy investigada.

Taragano y col. (1997) estudiaron el efecto de la actividad de agua en la producción de pectinasas por *Aspergillus niger*. Ellos observaron que al aumentar la cantidad de glucosa en el medio de cultivo se promueve una disminución en la actividad de agua lo que tiene un efecto negativo en la producción de biomasa, en la actividad pectin-esterasa y pectin-liasa, mientras que para la enzima poligalacturonasa se presenta un efecto positivo con la disminución de la actividad de agua.

Por otro lado la actividad de agua puede ser modificada por la adición de sales, azúcares y diferentes tipos de polioles. Acuña-Arguelles y col. (1994) estudiaron el efecto de utilizar etilen glicol, sorbitol y glicerol para modificar la actividad de agua en el medio de cultivo en la producción de pectinasas de *A. niger*. En ese trabajo se determinó que al disminuir la actividad de agua de 0.98 a 0.9 va disminuyendo la actividad enzimática en más de un 50%. Es así, que una variación de la actividad de agua en la FMS tiene un efecto directo en las enzimas.

Otro aspecto importante es que los residuos agroindustriales presentan una gran cantidad de bacterias que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos de interés, Mugnier y Jung (1985) estudiaron el efecto de la actividad de agua en el crecimiento de bacterias y hongos, determinaron que conforme va aumentando la actividad de agua de 0.06 a 1 el crecimiento de bacterias gram-negativas como *Rhizobium japonicum*, *R. meliloti*, *Agrobacterium tumefaciens*, etc. va disminuyendo, mientras que el crecimiento del hongo *Penicillium candidum* va aumentando hasta permanecer constante.

La  $a_w$  y el contenido de humedad del sustrato pueden aumentar o disminuir dependiendo de las condiciones bajo las cuales el proceso de FMS es dirigido. La evolución de calor catabólico puede conducir a un rápido descenso en el contenido de humedad debido a la evaporación presente si se emplea aireación forzada. La aireación con aire saturado de agua, puede provocar un incremento en el nivel de humedad (Lindenfelser y Ciegler, 1975; Nishio y col., 1979). La acción microbiana sobre el sustrato puede conducir a un cambio en el  $a_w$  del sustrato. La oxidación de carbohidratos produce agua, lo que incrementa la  $a_w$  del sustrato si el agua no es removida durante el proceso (Lindenfelser y Ciegler, 1975; Raimbault y Alazard, 1980; Durand y Chereau, 1988). Sin embargo, la cantidad de agua producida por el metabolismo es insuficiente para reemplazar el agua perdida por evaporación durante la aireación forzada (Reid, 1989).

### Temperatura

La importancia de la temperatura en el desarrollo de un proceso biológico es tal que puede determinar efectos tan importantes como la desnaturalización de proteínas, inhibición enzimática, inducción o inhibición de la producción de un metabolito particular o muerte celular.

Los procesos quimioheterotróficos son exotérmicos y la generación de calor por altos niveles de actividad microbiana dentro de los sólidos puede conducir a gradientes térmicos que dependen de la limitada capacidad de transferencia de calor de los sustratos sólidos (Mudgett, 1986) lo cual, podría ser contraproducente para la formación de biomasa o producto. Debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen en los procesos de FMS, la generación de calor metabólico por unidad de volumen es mucho más

grande que la que se presenta en los cultivos líquidos (Smith y Aidoo, 1988). En procesos aeróbicos, la generación de calor puede ser aproximada por la tasa de evolución de CO<sub>2</sub> o de consumo de O<sub>2</sub>. De acuerdo con Reid (1989) cada mol de CO<sub>2</sub> producido durante la oxidación de lignina libera aproximadamente 475 KJ. Por lo tanto, es importante medir la evolución de CO<sub>2</sub> durante los procesos de FMS ya que está directamente relacionada al riesgo del incremento de temperatura. La tasa de generación metabólica de calor puede ser aproximada a partir de la tasa de evolución de CO<sub>2</sub> (Figueroa-Montero y col., 2011b).

La temperatura tiene dos efectos sobre los microorganismos, a medida que se eleva la temperatura, las reacciones enzimáticas van siendo más rápidas y el crecimiento se acelera, mientras que por encima de cierta temperatura las proteínas empiezan a sufrir desnaturalización, sufriendo daños irreversibles. Por lo tanto, en un cierto rango de temperaturas un aumento en la temperatura supone un incremento en el crecimiento y metabolismo hasta un punto en que se presenten las reacciones de inactivación de las enzimas. *R. pusillus* presenta un rango amplio de temperaturas de crecimiento que va desde los 30° hasta los 50°C, siendo tolerante a los 55°C. Se sabe que este hongo esporula mejor a 30°C, por lo que en muchos trabajos publicados la producción de inóculo se lleva a cabo a esta temperatura (Christov y col., 1999). Mientras que la mayor abundancia del micelio se presenta a 40°C. Por otro lado, el almacenamiento de este hongo a temperaturas entre los 0° y 5°C provoca que al momento de ser utilizado se observe que la velocidad de crecimiento disminuye y los periodos de latencia se prolonguen.

En el trabajo de Acuña-Arguelles y col. (1995) se observa que la producción de una enzima endo-pectinasa de *A. niger* se ve afectada por la temperatura de incubación tanto en medio sumergido como en medio sólido, a temperaturas mayores a 60°C se tiene una menor actividad que a 50°C.

La remoción del calor es probablemente el factor más crucial en los procesos de FMS en gran escala (Laukevics y col., 1984). Los dispositivos convencionales de enfriamiento por conducción o convección son inadecuados para disipar el calor metabólico debido a la pobre conductividad térmica de la mayoría de los sustratos sólidos y resulta en inaceptables gradientes de temperatura. Únicamente los dispositivos de enfriamiento

evaporativo proveen la suficiente capacidad para la eliminación de calor (Prior y col., 1992). Sin embargo, la función primaria de la aireación durante los FMS aeróbicos es suministrar oxígeno para el crecimiento celular y arrastrar el dióxido de carbono producido. También cumple una función fundamental en la transferencia de calor y humedad entre los sólidos y la fase gaseosa. Los procesos más eficientes para el control de la temperatura son la evaporación de agua, la agitación del lecho de fermentación y la circulación interna de aire (Figueroa-Montero y col., 2011b).

### Aireación

La aireación cumple con cuatro funciones principales en la FMS (a) mantener las condiciones aeróbicas, (b) retirar el dióxido de carbono, (c) regular la temperatura del sustrato y (d) regular el nivel de humedad (Durand y col., 1988).

La tasa óptima de aireación en un proceso FMS, estará determinado por la naturaleza del microorganismo empleado, los requerimientos particulares de oxígeno para el crecimiento y la síntesis de producto sobre los nutrientes dados, la cantidad de calor metabólico que debe ser disipada, el grado al cual el CO<sub>2</sub> y otros metabolitos volátiles son eliminados, el espesor del sustrato y su densidad de empaque (inversamente relacionada con el volumen de espacio poroso) y el contenido de humedad (Lonsane y col., 1985). En algunos casos una aireación elevada es esencial para una productividad óptima. (Silman y col., 1979; Silman, 1980).

En los procesos de fermentación de medio líquido el suministro de oxígeno es varias veces el factor limitante para el crecimiento debido a la baja solubilidad del oxígeno en agua. En contraste, un proceso en estado sólido permite el libre acceso del oxígeno atmosférico hacia sustrato. La aireación puede inducir reacciones metabólicas, ya sea por estrés de agua, estrés de calor o cambios de temperatura.

Un criterio para expresar la aireación en un sistema en particular es obtenido por la intensidad de flujo de aire o VKgM (Rodríguez-León y col., 1985). Este valor es el flujo de aire expresado por unidad de peso de sustrato, comúnmente como  $L_{\text{aire}} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (Durand y col., 1988).

Desgranges y Duran (1990) estudiaron el efecto de la concentración de CO<sub>2</sub> en la producción de pectinasas de los hongos *A. niger* y *Trichoderma viride*. En este trabajo se determinó que al aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> de 0 a 20% la actividad poligalacturonasa incrementa. En el caso de la actividad pectin esterasa la actividad va aumentando cuando se tiene una concentración de CO<sub>2</sub> del 10%, más allá de esta concentración la actividad cae. La actividad pectin liasa va disminuyendo conforme va aumentando la concentración de CO<sub>2</sub>.

Figuroa-Montero y col. (2011) estudiaron el efecto de la circulación interna de aire por convección. Encontraron que al aumentar el  $N_{Re}$  en el “headspace” de un biorreactor de charolas tuvo un efecto positivo en la actividad enzimática de la invertasa, teniendo un aumento de hasta el 100% en la actividad relativa debido a que se evita el aumento de la temperatura en el lecho de fermentación por efecto de la circulación interna.

### pH

La acidez o alcalinidad de una solución se expresa por el valor de pH. Cada microorganismo posee un rango de pH para su crecimiento y actividad, con un valor óptimo dentro de ese rango. El pH de un cultivo puede cambiar en respuesta a las actividades metabólicas de los microorganismos. La secreción de ácidos orgánicos como ácido acético, ácido cítrico ó ácido láctico, ocasionan un descenso en el pH. Por otro lado, la asimilación de ácidos orgánicos que pueden estar presentes en ciertos medios puede conducir a un aumento en el pH.

La fuente de nitrógeno también causa que el pH cambie (Wang y col., 1979; Conney, 1981). El consumo de sales de amonio usualmente disminuye el pH durante el crecimiento microbiano. Debajo de pH 9 el amonio existe como  $NH_4^+$  y es incorporado dentro de la célula bacteriana como  $R-NH_3^+$  (donde R denota un esqueleto de carbono) de tal manera que un ión de hidrógeno es generado durante el consumo de amonio. Cuando el nitrato es usado como fuente de nitrógeno los iones hidrógeno del medio son consumidos para reducir los iones de nitrato a  $R-NH_3^+$ , causando que el pH se eleve. El pH también tiende a aumentar si compuestos amino orgánicos son desaminados cuando son usados para el crecimiento.

El uso de nitrato de amonio puede inicialmente causar una acidificación del medio durante la asimilación del amonio cuando la asimilación del nitrato está reprimida, con una subsiguiente alcalinización cuando comienza a emplearse el nitrato como fuente alternativa de nitrógeno una vez que el amonio se ha agotado (Morton y MacMillan, 1954). Cuando la urea es empleada en un medio, el pH puede aumentar debido a su descomposición, el nivel de pH incrementa dependiendo de la concentración de urea (Mitchell y col., 1988). El sustrato sólido por si solo también puede cambiar el pH.

En los cultivos en estado sólido, es muy difícil controlar el pH; por lo tanto es deseable que el microorganismo usado tenga un amplio rango de pH y un pH óptimo para su crecimiento (Mitchell y col., 1988). La mayoría de los microorganismos crecen en un rango de pH de 3 a 4 unidades, donde el pH óptimo para su crecimiento está en un rango de pH de 1.5 unidades (Wang y col., 1979). Los hongos filamentosos crecen bien dentro de un rango de pH de 2 a 9, con un óptimo en la región de pH de 3.8 a 6 (VanDemark y Batzing, 1987; Cooney, 1981).

En un residuo agroindustrial donde hay una gran variedad de microorganismos el trabajar a un pH menor de 4, promueve el crecimiento de bacterias, las cuales producen ácidos orgánicos que afectan el crecimiento de los hongos. Además la acidificación en el interior de una célula provoca una pérdida en el transporte de nutrientes, por lo que los hongos no pueden producir suficiente energía para mantenerse lo que conduce a la muerte.

En cultivos en donde el medio de cultivo no se renueva, el pH cambia durante el crecimiento a consecuencia de las reacciones metabólicas que consumen o producen sustancias ácidas o básicas. Es por esto que con frecuencia se añaden sustancias amortiguadoras con el propósito de mantener el pH más estable. Para valores de pH 6 a 7.5 el amortiguador más usado es el de fosfatos por lo que normalmente se añade  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al medio.

Malvessi y Moura da Silva (2004), encontraron que si mantienen el medio de cultivo entre un pH de 3 y 4 se ve un aumento considerable en la producción de la enzima poligalacturonasa de *Aspergillus oryzae*, debido a que al aumentar o disminuir mas el pH la actividad se va perdiendo considerablemente.

Chadha y col. (2004) producen fitasa (EC 3.1.3.6) de *R. pusillus* por FMS. La fitasa es considerada una fosfatasa ácida la cual produce fosfato y ácido fítico. Utilizando salvado de trigo y asparagina (0.1%) en el medio de cultivo se indujo la producción de la enzima fitasa, otros componentes del medio de cultivo fueron licor de maíz (0.3%) que fue utilizado como fuente de nitrógeno, KCl (0.05%) utilizado principalmente para la bomba de sodio-potasio, MgSO<sub>4</sub> (0.05%), FeSO<sub>4</sub> (0.001%), MnSO<sub>4</sub> (0.001%). La temperatura de incubación fue de 50°C y el pH fue variando lo que ocasionó que la producción de la enzima no fuera constante. A pH 4 la actividad de la fitasa fue de 4 U/g mientras que cuando el medio de cultivo presentaba pH de 8 la actividad de la fitasa era de 9 U/g. Este es un claro ejemplo de la importancia de mantener constantes el pH inicial y final del medio de cultivo.

#### **2.6.4 Condiciones nutricionales que afectan la producción de enzimas**

Los residuos agroindustriales son considerados como los mejores sustratos para la producción de enzimas por FMS, tal es el caso del bagazo de caña, el rastrojo de maíz, salvado de trigo, pulpa de café, residuos de frutas cítricas, residuos de verduras, orujo de olivo, residuos de manzana, copra de coco etc. (Pandey, 2003).

Henriksson y col. (1999) producen pectinasas en medio líquido usando a *R. pusillus*, se utilizó pectina de frutas cítricas para la inducción de las pectinasas. Se mantuvo el pH del medio de cultivo en 5. Otras enzimas que se producen en menor proporción fueron las celulasas y manasas producidas durante el cultivo.

La composición del medio de cultivo y el inductor utilizado en la FMS, dará lugar a que se exprese una u otro tipo de enzima. Es así, que la pulpa de café, al presentar pectina en su estructura, beneficiaría la producción de enzimas pectinolíticas que ayudaran a degradar la pared celular de la pulpa de café para la extracción del ACl.

Channe y Shewale (1995) estudiaron el efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de pectinasas de *Sclerotium rolfsii*. Ellos concluyeron que el mejor sustrato para inducción de esta enzima fue la pectina, el pH debe estar entre 6 y 7. La pectinasa no es inducida por fuentes de carbono como lactosa, manitol, glicerol, maltosa y

fructosa. En el trabajo de Solís-Pereira y col. (1993) se estudió el efecto de la fuente de carbono en la producción de pectinasas por *Aspergillus niger*. Ellos encontraron que, conforme se aumenta la cantidad del inductor pectina en el medio de cultivo se incrementa la producción de la enzima pectinasa. Por otra parte, el ácido galacturónico, la sacarosa o la glucosa tiene un efecto positivo en la producción de la pectinasa, el ácido galacturónico es el mejor inductor de la actividad enzimática.

La producción de poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) por *A. niger* CH4 en FMS aumenta al usar como fuente de carbono glucosa, sacarosa y ácido galacturónico. Sin embargo al usar estas mismas fuentes de carbono en medio líquido la producción de la enzima disminuye 4.9 veces (Pandey y col., 2003).

### **2.6.5 Medición en línea de parámetros durante la fermentación en medio sólido**

El monitoreo y control de parámetros de la FMS es importante para medir la productividad, llevar a cabo la optimización y escalamiento de los procesos. La toma de muestras periódicas para su análisis resulta un problema ya que puede ocasionar contaminaciones durante la FMS. La determinación de la concentración de biomasa producida durante la FMS resulta complicado debido a que se adhiere y penetra los soportes usados en la FMS. El monitoreo en línea del consumo de O<sub>2</sub> y la producción de CO<sub>2</sub> pueden ser usados como medidas indirectas del crecimiento y de la actividad fisiológica de los microorganismos durante la FMS (Pandey, 2003).

La medición en línea del CO<sub>2</sub> también es importante para estimar la generación de agua metabólica, la producción de biomasa y la generación de calor metabólico en procesos de FMS (Figueroa-Montero, 2011).

En la fase gaseosa de los procesos aerobios, el O<sub>2</sub> debe ser transferido al medio donde se desarrolla la actividad microbiana y el CO<sub>2</sub> y otros gases que pueden ser inhibitorios deben ser removidos de los procesos de FMS. La aireación cumple con cuatro propósitos en la FMS: a) mantener las condiciones aerobias, b) remover el CO<sub>2</sub>, c) regular la temperatura del sustrato y d) regular el nivel de humedad (Durand y col., 1998). La aireación en un sistema de cultivo es expresada como la intensidad de flujo de aire o VKgM.

Este valor es el flujo de aire expresado por unidad de peso de sustrato  $L_{\text{aire}} \text{ Kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Figueroa-Montero, 2011).

La tasa de aireación en FMS está determinada por el tipo de microorganismo empleado, los requerimientos particulares de  $\text{O}_2$ , la síntesis del producto que se desea obtener, la cantidad de calor que se deba disipar, la concentración de  $\text{CO}_2$  y otros metabolitos volátiles presentes, la densidad del empaque, el espesor del sustrato y contenido de agua, por lo que resulta importante determinarla y controlarla (Lonsane y col., 1985).

La medición de la concentración porcentual de  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  y flujo del gas en FMS simultáneamente resulta complicada ya que la mayoría de los actuales sistemas comerciales permiten solo medir en un punto de análisis del proceso de FMS lo que provoca errores experimentales debido a la falta de mediciones. Con la finalidad de mejorar el monitoreo en línea de la concentración de  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  y medición de flujo de la fase gaseosa de los diferentes procesos que lo requieran varios investigadores han propuesto sistemas y metodologías para tener mediciones precisas y confiables. Saucedo y col. (1992; 1994) describen un sistema de monitoreo en línea, por cromatografía de gases, para FMS aeróbico y anaeróbico en el cual la cuantificación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . El cromatógrafo de gases tenía un detector de conductividad térmica y un inyector automático (Modelo IGC 11, Delsi, Francia) el gas acarreador usado fue He. El sistema pudo hacer mediciones en línea de diferentes columnas o unidades experimentales. El programa utilizado para el almacenamiento e integración de los datos fue el Chroma Biosystem. Determinan la eficiencia del sistema para el monitoreo en línea de la concentración de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ , presentando reproducibilidad en sus datos, sin embargo no obtuvieron mediciones en línea del flujo.

Un sistema similar al descrito anteriormente es el reportado por Carvalho y col. (2006), donde la producción de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  fue medida en línea utilizando un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-8a, Japón), el gas acarreador fue He y los datos fueron almacenados e integrados con ayuda del programa Chroma Biosystem, sin embargo de las

10 columnas de fermentación empleadas, sólo pudieron monitorear una, por lo que no presentan repeticiones en sus mediciones.

Christensen y col. (1995) pusieron en marcha un sistema automático de monitoreo en línea, multicanal (Multipoint Sampler Type 1309) que fue usado a nivel planta piloto y un flujo de aire mínimo de 130 ml/min, el cual presentó alta sensibilidad y reproducibilidad. La concentración de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e hidrocarburos se midió por espectrofotometría foto-acústica y magneto-acústica (PAS/MA, por sus siglas en inglés), el almacenamiento y manejo de datos se realizó mediante un equipo Innova AirTech Instrument 1313.

Pliego-Sandoval y col. (2012) diseñaron un sistema que consta de un analizador de aire Agilent Model 5067-0223, el cual no registra el flujo en la base de datos. El sistema puede monitorear hasta 24 canales los cuales están integrados en un multiplexor. El sistema tiene la capacidad de medir la concentración de CO<sub>2</sub> y de O<sub>2</sub> (Pasco, CI-6561 y CI-6562) en la fase gaseosa al ser conectado a una interface Pasco ScienceWorkshop 750 que a su vez está conectada por vía USB a una computadora donde se capturan las mediciones.

Smith y col. (1996) diseñaron un sistema para medir la composición gaseosa de una incubadora que en su interior tenía cajas de Petri, una bomba succiona una muestra de gas de la incubadora para ser analizada por un detector de O<sub>2</sub> paramagnético (Servomex 1100) y un detector infrarrojo (Servomex 1400), para que el gas en el interior de la incubadora sea homogéneo al momento de sacar la muestra gaseosa, se enciende un sistema de ventiladores a intervalos regulares de tiempo.

Van Lier y col. (1994) analizan la fase gaseosa generada durante el composteo usando dos equipos comerciales, para el CO<sub>2</sub> fue el Siemens Ultramat 22P, que tiene en su interior un detector infrarrojo y para el O<sub>2</sub> fue el Siemens Oxymat 2 que es un detector paramagnético. Ambos equipos almacenaron los datos de manera independiente y al término de la fermentación la adquisición de datos se realizó conectando los equipos a un puerto serial de una computadora.

Gea y col. (2004) analizaron en línea la composición del gas con un detector de O<sub>2</sub> (Sensox, Sensotran, España) y un detector de CO<sub>2</sub> (Sensotran IR, Sensotran, España) los cuales están conectados a un sistema de adquisición de datos que a su vez controla la cantidad de O<sub>2</sub> y flujo del proceso (Sensotran mod. MR3A18SVVT), manteniendo la concentración del O<sub>2</sub> en un 10%. Una variante de este sistema es el reportado por Kulcu y Yaldiz (2004) donde no miden el consumo de O<sub>2</sub> pero agregan un multiplexor de 3 canales para poder medir la concentración de CO<sub>2</sub> en tres diferentes niveles del reactor. En el 2008 los mismos autores a su sistema le removieron el multiplexor y agregaron un detector de O<sub>2</sub> electroquímico.

Puyuelo y col. (2012) diseñaron un reactor a nivel piloto para el composteo de residuos municipales el cual tenía integrado un medidor de flujo, un sensor de temperatura (Desing Instruments, Barcelona) y un detector de O<sub>2</sub> (Xgard, Crown, USA). La adquisición de datos y el control del sistema se realizaron mediante el programa LabView 8.6.

Weber y col. (2001) desarrollaron un sistema de monitoreo para un reactor de lecho empacado, el cual contenía un controlador de flujo (0 a 50 L/min). El aire que entraba al reactor era humidificado y al salir del reactor se deshidratava para no afectar los detectores. La concentración de O<sub>2</sub> se midió con un detector paramagnético (Xentra 4100) y el CO<sub>2</sub> se midió con un detector infrarrojo (Servomex, 1400), el flujo de trabajo fue de 100 ml/min. La adquisición y manejo de datos fue con el software LabView.

Gelmi y col. (2000) realizaron el monitoreo en línea de cuatro columnas de fermentación mediante un sistema que constaba un medidor de flujo (Aalborg Instruments GFM17), un detector del O<sub>2</sub> electroquímico (Columbus Instruments 0135-0345) y un detector de CO<sub>2</sub> infrarrojo. La adquisición de datos se realizó con ayuda de PLC's (controladores lógicos programables) conectados a una computadora la cual fue registrando en el tiempo el flujo y concentración (%) de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> de cada columna.

## 2.7 ENZIMAS

La degradación de los polímeros de la pared celular requiere de varias enzimas hidrolíticas como hemicelulosas, xilanasas, pectinasas y esterases. Estas enzimas son producidas por diferentes microorganismos (Asther y col., 2002). Un gran número de estas enzimas son producidas por FMS (Pandey, 2003).

### 2.7.1 Clorogenato esterasa (CIE)

Schöbel y Pollmann en 1980 aislaron y caracterizaron una enzima producida por *Aspergillus niger* capaz de hidrolizar el ACI en AC y AQ de manera equimolar. Esta enzima es conocida como clorogenato hidrolasa, clorogenasa o clorogenato esterasa (EC 3.1.1.42). Crepin y col. en el 2004 al clasificar las enzimas feruloil esterases (FAE) mencionan que la FAE tipo C presenta una similitud estructural con la clorogenato esterasa (CIE). En 2005, Asther y col. (2005) determinan que el extracto enzimático obtenido de *Aspergillus niger* usando bagazo de caña, puede hidrolizar ACI, metil cafeato y metil *p*-cumarato lo que sugiere la presencia de una o más enzimas. Concluyeron que las actividades enzimáticas medidas se debían a dos enzimas: FAE tipo B y CIE, por lo que la producción de la FAE y la CIE estaría acoplada. Faulds en el 2010 menciona que la FAE (EC 3.1.1.73) es conocida como CIE, ya que la FAE puede hidrolizar el ACI a AC y AQ, además estructuralmente presentan una similitud > 90%. Es así, que actualmente existe una controversia sobre el hecho que si la CIE y la FAE son la misma enzima o diferentes, o si la FAE puede presentar la actividad de la CIE. Aún no se tienen reportes de si la CIE presenta la actividad de la enzima FAE.

La CIE es una carboxil ester hidrolasa que hidroliza el enlace éster entre el ACI (5-cafeoilquínico y 3-cafeoilquínico), cafeoil y *p*-cumaroil tartrato, etil y benzil cinamatos y ácido isoclorogénico. Presenta 3 residuos de aminoácido importantes como son la serina (Ser), histidina (His) y ácido glutámico (Glu) (Kishimoto y col., 2005; Benoit y col., 2007). El pH óptimo de la CIE es de 6 a 7.5 (Adachi y col., 2008), la inactivación térmica en una CIE de *Aspergillus* sp. se presenta a los 60°C por 30 min. Los valores de Km reportados para CIE van desde 0.74 mM a 0.85 mM. La termoestabilidad de la CIE resulta relevante

para su aplicación en la industria en la obtención de AC y AQ y en la clarificación de jugos de frutas (Adachi y col., 2008).

En cepas de *Aspergillus* la producción de CIE es inducida al usar salvado de trigo en FMS (8 días) y al usar pulpa de remolacha azucarera (Adachi y col., 2008) en medio líquido (11 días). La pulpa de café al ser impregnada con medio Czapek también promueve la inducción de la CIE. Schobel y Pollmann en 1980 y Barde y Dubourdie en 1998 aislaron una CIE (EC 3.1.1.42) de un extracto enzimático pectinolítico producido por *A. niger*. Couteau y col. en el 2001 demostraron la habilidad de una bacteria del colon humano para producir enzimas con la misma actividad de la CIE. Estas enzimas no fueron caracterizadas a detalle pero por sus características bioquímicas se cree que se trata de enzimas diferentes (Asther y col., 2005).

Las cepas de *Aspergillus* son las más utilizadas para la producción de CIE, se ha observado que estas cepas presentan una actividad volumétrica de 0.02 a 0.18 nkat/ml. Asther y col. (2005) reportan una actividad de 0.46 nkat/ml para una CIE producida por *A. niger* BRFM131 (12 días) usando pulpa de remolacha azucarera. Esta enzima además presentó actividad sobre metil cafeato (0.94 nkat/ml) y metil *p*-cumarato (1.12 nkat/ml).

La CIE es utilizada para modificar la estructura de compuestos fenólicos por esterificación, incrementando en algunas casos la actividad biológica (Ramírez y col., 2008). Además es utilizada para catalizar las reacciones de transesterificación para obtener compuestos con mayor actividad antioxidante, antifúngica y antiviral, tal es caso del ACI y el AC que pueden ser transformados en 2-feniletíl cafeato (Kishimoto y col., 2005).

Varios de los reportes de la literatura que han trabajado con la enzima CIE fueron dirigidos a la obtención de AC que es un antioxidante que se encuentra en las plantas y se puede obtener a partir de la hidrólisis del ACI. No se ha puesto atención en la producción del ACI, el cual presenta propiedades anti-oxidantes, anti-cancerígenas y anti-inflamatorias que resultan atractivas para la industria farmacéutica y de alimentos, además su valor comercial en el mercado, extraído con disolventes orgánicos de granos de café verde con una pureza >95% está en aproximadamente en \$16 mil/kg (3), por lo que sería rentable su obtención a partir de residuos agro-industriales como la pulpa de café. Una de las razones

de que no se extraiga el ACI de residuos agro-industriales es la falta de métodos adecuados de extracción y purificación del ACI.

### **2.7.2 Feruloil esterasa (FAE)**

Las feruloil esterasas y cinamoil esterasas son una subclase de carboxil ester hidrolasas. Estas enzimas hidrolizan los enlaces éster formados entre los ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, cafeico, sinápico y *p*-cumárico) y los azúcares primarios (L-arabinosa y D-galactosa) de los polisacáridos que se encuentran en la pared celular vegetal (Borneman y col., 1990; Faulds y Williamson, 1999).

Faulds (2010) menciona que la feruloil esterasa puede ser una enzima del tipo cinamoil esterasa, cinamoil ester hidrolasa y clorogenato esterasa. Los ácidos hidroxicinámicos (AH) pueden obtenerse mediante la hidrólisis de la pared celular, por medio de cinamoil esterasas (EC 3.1.1), las cuales actúan sinérgicamente con xilanasas, pectinasas y amilasas, las cuales degradan la pared celular de las plantas facilitando el acceso de las cinamoil esterasa y FAE. Estas enzimas permiten liberar los AH a partir de productos y subproductos agrícolas como el salvado de trigo, el salvado de maíz, la pulpa de remolacha y la pulpa de café. Esta es la razón por la que estas enzimas han sido estudiadas con gran interés durante los últimos años (Faulds y Williamson, 1991; Kroon y Williamson, 1999).

Las feruloil esterasas (EC 3.1.1.73) son las enzimas responsables de romper la unión entre polisacáridos (como xilanos y pectinas) o polímeros y el ácido ferúlico o los dímeros de ácido ferúlico, dependiendo de su actividad éstas enzimas se clasifican en tipo A, B, C y D (Levasseur y col., 2006). A partir del descubrimiento de estas enzimas, las publicaciones relacionadas con la FAE aumentaron notoriamente, así para los períodos de 1990 - 2000 y 2001 - 2006 se publicaron 24 y 44 trabajos, respectivamente. En general las FAE hidrolizan el enlace éster entre el ácido ferúlico y los polímeros (Mc Auley y col., 2004). A continuación se muestra una clasificación de las feruloil esterasas reportadas hasta el momento (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9.** Clasificación de las feruloil esterasas

Parámetros	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Otros nombres	F AE-III	CinnAE	-	-
Hidrólisis de metil ésteres	Metil ferulato, Metil sinapato, Metil <i>p</i> -cumarato	Metil ferulato Metil cafeato, Metil <i>p</i> -cumarato	Metil ferulato, Metil sinapato, Metil <i>p</i> -cumarato, Metil cafeato	Metil ferulato, Metil sinapato, Metil <i>p</i> -cumarato, Metil cafeato
Liberación de ácidos diferúlicos	5-5*	No	No	5-5'
Hidrólisis enlace ester	C5 L-arabinosa ácido ferúlico	C2 L-arabinosa ácido ferúlico	-	-
AH extraídos en la PC	Ácido ferúlico	Ácido <i>p</i> -cumárico, Ácido cafeico	-	-

\* Sólo se presenta en monocotiledóneas

Los ácidos ferúlico y cafeico presentan efectos opuestos sobre la producción de la FAE, el primero de inducción/regulación positiva y el segundo de represión en la producción de la enzima FAE, obtenida a partir de los cultivos de *Aspergillus niger*. Sin embargo, aún no se conoce con detalle el mecanismo de este proceso (Faulds y Williamson, 1999).

Se han utilizado compuestos metilados de los AH para determinar la afinidad y actividad hidrolítica de las diferentes cinamoil esterasas sobre los enlaces éster formados por los AH y polímeros presentes en la pared celular. Por ejemplo, tenemos al metil ferulato que presenta un grupo metilo unido al grupo COOH del ácido ferúlico (AF), semejando la unión del AF con un molécula de L-arabinosa por medio de un enlace éster, al ser hidrolizado el enlace éster se tiene la liberación del AF (Faulds y Williamson, 1996). En estos compuestos la parte correspondiente al azúcar, como sucede en los sustratos naturales, es reemplazada por un metilo. En la actualidad se tienen reportados valores de la constante cinética Km en presencia de metil ferulato para FAE A o FAE III obtenidas a partir de diferentes especies de *A. niger* y *A. awamori* (Tabla 2.10).

**Tabla 2.10.** Constantes cinéticas de la feruloil esterasa en presencia de metil ferulato

Microorganismo	Km	Referencia
<i>A. niger</i>	0.75 mM	Record, 2005
	0.76 mM	Vries, 2001
	2.08 mM	Zhao, 2000
	0.78 mM	Faulds, 2005
	0.308 mM	Benoit, 2006
<i>A. awamori</i>	0.72 mM	Vries, 2001

La especificidad de las cinamoil esterases se puede determinar por medio de oligosacáridos cinamatados. Estos se obtienen mediante la hidrólisis de la pared celular de diferentes vegetales, empleando ya sea condiciones ácidas o bien mediante mezclas de enzimas (Colquhoun y col., 1994). Por ejemplo, los oligosacáridos cinamatados provenientes de plantas dicotiledóneas son utilizados para determinar la especificidad de algunas feruloil esterases, tal es el caso del [2-O-(E-feruloil)- $\alpha$ -L-arabinofuranosil]-(1-5)-L-arabinofuranosa (Ara<sub>2</sub>F). Este oligosacárido ferulato es obtenido a partir de la pared celular de dicotiledóneas como la remolacha azucarera y la espinaca. Consiste de un ácido ferúlico unido por un enlace éster (1 - 2) a la L-arabinosa, la cual a su vez esta unida por un enlace (1 - 5) a otra molécula de L-arabinosa. El Ara<sub>2</sub>F es un sustrato modelo para determinar la actividad sobre los enlaces feruloil éster (1 - 2), (Williamson y col., 1998 y Ruiz Sánchez, 2002). Otro ejemplo, es el O-[6-O-(E-feruloil)- $\beta$ -D-galactopiranosil]-(1-4)-D-galactopiranososa (Gal<sub>2</sub>F). Este oligosacárido se obtiene también a partir de la espinaca y de la pulpa de remolacha azucarera. En este caso el ácido ferúlico se encuentra unido por un enlace (1 - 6) a la molécula de galactosa, también unida por un enlace (1 - 4) a una segunda molécula de galactosa (Ruiz-Sánchez, 2002).

La síntesis de feruloil y *p*-cumaroil esterases son inducidas por componentes de la pared celular vegetal como es el caso del xilano de avena, la celulosa, el salvado de trigo, la paja de avena o la pulpa de remolacha azucarera usando cepas de *A. niger* (Faulds y Williamson, 1999), *Streptomyces avemitilis* (Ferreira y col., 1999), *A. awamori* (McCrae y

col., 1994), *Neocallimastix* MC-2 (Borneman y col., 1990), *Penicillium pinophilum* (Castanares y col., 1992).

Las FAE han sido caracterizadas y purificadas de diferentes microorganismos como: *Streptomyces olivochromogenes*, *Clostridium stercorarium*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas fluorescens*, *Penicillium funiculosum*, *Talaromyces stipitatus* (Kroon y Williamson, 1999). Las feruloil y cinamoil esterases de *A. niger* catalizan la reacción entre los sustratos modelo metilados de los ácidos hidroxicinámicos y los oligosacáridos ferulatos. Estas enzimas son extracelulares y su expresión es inducible (Asther y col., 2002). La actividad enzimática de la feruloil esterasa se incrementa en las primeras etapas del crecimiento de los microorganismos. El tipo y actividad enzimática de las feruloil esterases se modifica con el tipo de sustrato y tipo de cultivo en el que se lleve a cabo. La feruloil esterasa de *A. niger* presenta diferentes títulos de actividad enzimática al producirse por cultivo sólido o cultivo sumergido. En cultivo sólido, la feruloil esterasa obtenida tiene una mayor actividad sobre el metil cafeato y metil *p*-cumarato, mientras que en metil ferulato y metil sinapato la actividad no presenta diferencias significativas. Estos resultados indican que la fuente de carbono y las condiciones de cultivo influyen en la expresión de diferentes tipos de feruloil esterasa (Asther y col., 2002). En la actualidad este tipo de enzimas son importantes en la extracción de los AH.

### **2.7.3 Pectinasa**

La pectina es degradada por pectinasas. Existen varios tipos de enzimas pectinolíticas, se pueden clasificar en tres grupos: enzimas desesterificantes (pectin esterases), enzimas despolimerizantes (hidrolasas y liasas) y protopectinasas. La pectin esterasa (pectina pectilhidrolasa, 3.1.1.11) también conocida como pectina metil esterases, estas catalizan la desesterificación de los grupos metilo de la pectina dando lugar al ácido poligalacturónico o pectato. Las enzimas despolimerizantes pueden romper los enlaces  $\alpha$  (1-4) glucosídicos entre los monómeros de ácido galacturónico de la pectina por hidrólisis (hidrolasas) o por transeliminación (liasas). En el caso de las hidrolasas, éstas son activas a pH ácido y pueden ser inhibidas por el ión calcio (Guevara y col., 1997). Las protopectinasas son enzimas que solubilizan la protopectina. Estas se clasifican en dos,

tipo A que degrada el ácido poligalacturónico de la protopectina y tipo B que degrada las cadenas de polisacáridos que conectan el ácido poligalacturónico con otros constituyentes de la pared celular (Kashyap y col., 2001).

Las pectinasas producidas por FMS son obtenidas principalmente de *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. y otros hongos filamentosos (Pandey, 2003). Los residuos agroindustriales utilizados para la producción de las pectinasas son: residuos de manzanas, residuos de frutas cítricas, pulpa de café, bagazo de caña. La producción de pectinasas por FMS resulta atractivo porque estas enzimas son sintetizadas en altas concentraciones (Aguilar y col., 2008).

Las enzimas pectinolíticas son utilizadas en la industria de los alimentos, de textiles y del papel. Se emplean en la extracción, clarificación y concentración de jugos de frutas, clarificación de los vinos, extracción de aceites y extracción de aromas y pigmentos provenientes de plantas (Aguilar y col., 2008).

#### **2.7.4 Xilanasa**

La degradación enzimática del xilano se lleva a cabo por xilanasas que son enzimas glicosidasas las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4- $\beta$ -D-xilosídicos. El xilano es un polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa, además es el componente principal de la hemicelulosa. Las enzimas responsables de degradar el xilano son: las endo- $\beta$ -1,4-xilanasas (EC 3.2.1.8), que rompen la cadena de xilano formando oligosacáridos de cadena corta y las  $\beta$ -1,4-xilosidasas (EC 3.2.1.37) las cuales hidrolizan los enlaces esterres liberando la xilosa. Los diferentes grupos laterales del xilano son hidrolizados por una mezcla de acetilsterasas, arabinofuranosidasas, glucoronidasas. (Aguilar y col., 2008; Maciel y col., 2008). Los microorganismos productores de endoxilanasas son los pertenecientes al género de *Aspergillus*. Tenemos a *A. aculeatus*, *A. awamori*, *A. kawachii*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae* y *A. tubigensis*. Entre los microorganismos productores de  $\beta$ -xilosidasas tenemos a *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. pulverulentus*.

Las xilanasas producidas por microorganismos presentan varias aplicaciones biotecnológicas en la industria del papel y alimentaria, también en el tratamiento de residuos sólidos. Las xilanasas son utilizadas para degradar los oligosacáridos del xilano para obtener monosacáridos que pueden ser usados como aditivos y edulcorantes (Aguilar y col., 2008).

El complejo de xilanasas con celulasas son utilizadas para modificar la textura de la masa en la elaboración de pan y para incrementar la disponibilidad de los oligosacáridos provenientes del alimento para aves.

Actualmente ha crecido el interés por xilanasas que presenten propiedades térmicas y estabilidad del pH y catalítica (Aguilar y col., 2008).

### **2.7.5 Celulasa**

Las celulasas son un conjunto de enzimas capaces de degradar la celulosa a unidades de glucosa. La hidrólisis enzimática de la celulosa requiere de un efecto sinérgico de la acción de varias enzimas llamadas celobiohidrolasas, endoglucanasas o carboximetilcelulasas y  $\beta$ -glucosidasas (Narasimha y col., 2006).

Entre las celulasas tenemos: endo-1,4- $\beta$ -D-gluconasa (EC 3.2.1.4), estas enzimas actúan sobre la cadena principal de la celulosa hidrolizando los enlaces  $\alpha$ -1,4-glicosídicos; exo-1,4- $\beta$ -D-gluconasa (EC 3.2.1.91), actúan como exoenzimas y liberan la celobiosa y glucosa de los extremos de la cadena principal de la celulosa y  $\beta$ -D-glicosidasa ( $\beta$ -D-glucósido glucahidrolasa, EC 3.2.1.21) hidrolizan los oligosacáridos de la celulosa y transforman la celobiosa en glucosa (Pothiraj y col., 2006; Criquet, 2002).

Las celulasas son producidas por hongos y bacterias. Varias bacterias, actinomicetos y hongos filamentosos producen de manera extracelular las celulasas cuando crecen en sustratos celulolíticos. La presencia de lignina, y de la celulosa cristalina dificulta el acceso de las enzimas celulolíticas (Pothiraj y col., 2006).

Las celulasas producidas por FMS son obtenidas por *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Thermomyces* sp. *Aspergillus* sp.

(Pandey, 2003). La temperatura óptima de gran parte de las celulasas es 40°C, el pH de las celulasas está entre 3 y 9 (Coral y col., 2002).

## 2.8 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

En esta sección se muestran los fundamentos de las herramientas estadísticas que se usaron para determinar las condiciones de reacción enzimática y optimización de las condiciones de medio de cultivo para la producción de enzimas que nos permitieron extraer el ACl esterificado a la pared celular de la PC.

### 2.8.1 Diseño de mezclas

Los diseños de mezclas se emplean para determinar si el uso de las combinaciones de extractos producirá mejores resultados que el uso de los extractos monovarietales. Una propiedad importante es la cuantificación del cambio de la variable respuesta permitiendo evaluar su variación al cambiar las proporciones de los factores individuales, en este caso de las enzimas pectinasa, xilanasa y celulasa. El diseño simplex centroide con  $p$  componentes consiste de  $2^p - 1$  corridas en todas las mezclas primarias, binarias y terciarias. El diseño centroide es calculado mediante la fórmula (Montgomery, 2006):

$$x_1 = \frac{1}{p}, x_2 = \frac{1}{p}, \dots, x_p = \frac{1}{p}$$

En los diseños de mezclas, los factores son los ingredientes o componentes de una mezcla y por consiguiente sus niveles no son independientes:

$$0 \leq x_i \leq 1 \quad i = 1, 2, \dots, p$$

$$x_1 + x_2 + \dots + x_p = 1 \quad (\text{es decir, } 100\%)$$

Cada componente está sujeto a límites inferiores y superiores:

$$L_j \leq x_i \leq U_j$$

Lo cual se interpreta como  $L_j = 0\%$  y  $U_j = 100\%$  o más restrictivo según se requiera.

En los diseños simplex centroe de las corridas ocurren en la frontera de la región a estudiar y sólo una corrida se realiza con la combinación de los 3 factores (punto central), por lo que es deseable siempre agregar puntos adicionales en el interior de la región a estudiar, donde las mezclas estarán formadas con la totalidad de los componentes ( $p$ ) (Montgomery, 2006).

Los modelos de ajuste en el diseño de mezclas son:

Modelo lineal:

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3$$

Modelo cuadrático

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1,2} X_1 X_2 + \beta_{1,3} X_1 X_3 + \beta_{2,3} X_2 X_3$$

Modelo cúbico especial

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1,2} X_1 X_2 + \beta_{1,3} X_1 X_3 + \beta_{2,3} X_2 X_3 + \beta_{1,2,3} X_1 X_2 X_3$$

Modelo cúbico

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1,2} X_1 X_2 + \beta_{1,3} X_1 X_3 + \beta_{2,3} X_2 X_3 + \beta_{1,2,3} X_1 X_2 X_3 + \delta_{1,2} X_1 X_2 (X_1 - X_2) + \delta_{1,3} X_1 X_3 (X_1 - X_3) + \delta_{2,3} X_2 X_3 (X_2 - X_3)$$

Donde:  $\beta_{1\dots 3}$ ,  $\delta_{1\dots 3}$ , son los coeficientes de la ecuación;  $X_{1\dots 3}$ , son cada uno de los factores del diseño de mezclas (Soto-Cruz y col., 1999; Montgomery, 2006).

### 2.8.2 Diseño tipo Plackett-Burman

El diseño experimental tipo Plackett-Burman es considerado un diseño factorial fraccionado de dos niveles. A medida que el número de factores de un diseño  $2^k$  aumenta, el número de ensayos necesarios para obtener una réplica completa sobrepasa rápidamente los recursos (Montgomery, 2006; Box y col., 2008).

Los diseños factoriales fraccionados se encuentran entre los tipos más ampliamente usados para el diseño de procesos y obtención de productos así como para la detección y solución de problemas. Un uso importante está en los experimentos de escrutinio, también llamados de tamizado o cribado. Estos son experimentos donde se consideran muchos

factores con el fin de identificar a aquellos que tienen efectos importantes sobre la variable respuesta (Montgomery, 2006; Box y col., 2008).

Este tipo de diseños se realiza con la finalidad de identificar los factores que verdaderamente presentan un efecto sobre la variable respuesta. Los factores identificados se pueden estudiar en un futuro con mayor detalle.

Los diseños factoriales fraccionados se basan en tres principios básicos:

a) El principio de dispersidad de los efectos. El sistema o proceso es influido por alguno de los efectos principales o interacciones de orden inferior.

b) La propiedad de proyección. Los diseños factoriales fraccionados pueden proyectarse en diseños más grandes.

c) Experimentación secuencial. Se combinan corridas de dos o más factoriales fraccionados para tener un diseño más grande (Montgomery, 2006; Box y col., 2008).

En el diseño experimental tipo Plackett-Burman se tiene  $K = N - 1$  donde  $N$  es el número de ensayos y  $K$  es el número de factores. El diseño se basa en probar que al menos uno de los factores estudiados es responsable de las variaciones en la variable respuesta (Montgomery, 2006; Box y col., 2008).

La influencia de los factores sobre la variable respuesta está dada por:

$$\delta_A = \frac{\sum Y(+)}{n} - \frac{\sum Y(-)}{n}$$

Donde:  $\sum Y(+)$  y  $\sum Y(-)$  son la suma de las respuestas cuando el factor  $A$  es (+) y (-) y  $n$  es el número de veces que el factor es (+) y (-). Si:

$\sum Y(+)$  =  $\sum Y(-)$  No hay un efecto del factor  $A$  sobre la variable respuesta.

$\sum Y(+)$  >  $\sum Y(-)$  El efecto del factor  $A$  sobre la variable respuesta es positivo.

$\sum Y(+)$  <  $\sum Y(-)$  El efecto del factor  $A$  sobre la variable respuesta es negativo.

(Montgomery, 2006; Box y col., 2008).

### 2.8.3 Diseño factorial central compuesto

El diseño central compuesto consta de un factorial  $2^k$  con  $n_F$  corridas,  $2k$  corridas axiales o estrellas y  $n_C$  corridas centrales. Este diseño es muy eficiente para ajustar modelos de segundo orden. Hay dos parámetros en el diseño que deben especificarse: la distancia  $\alpha$  de las corridas axiales al centro del diseño y el número de puntos centrales  $n_C$  (Montgomery, 2006; Box y col., 2008).

El modelo de segundo orden ajustado para  $k = 3$  donde  $k$  son los factores es:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Donde:  $\beta_0$ , es el término constante;  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ , son los coeficientes de primer orden;  $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ , son los coeficientes cuadráticos y  $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ , son los coeficientes de los productos cruzados (Montgomery, 2006; Box y col., 2008).

### 3 ANTECEDENTES DIRECTOS

La producción de PC en México en el 2008 se estima que fue de 707.35 millones de toneladas de PC generadas del café cereza procesado por vía húmeda (INEGI-2009). El aprovechamiento de la PC y otros subproductos resulta prioritario para países productores de café por razones económicas, ecológicas y sociales.

Existen numerosos intentos por aprovechar los subproductos del café. Peñaloza y col. (1985) reportan el uso de procesos de fermentación en sustrato sólido, como vía para mejorar el valor nutritivo de la PC. Antier y col. (1995) reportan el uso de la PC para producir pectinasas con la finalidad de cubrir la demanda industrial de ese producto.

Se ha centrado la atención en identificar y cuantificar los compuestos fenólicos en diferentes variedades de café, tal es el caso del ACI y los AH, los cuales son componentes importantes de la pared celular de las plantas y presentan un interés comercial por sus propiedades anticancerígenas, anti-inflamatorias y antioxidantes. Ésta última propiedad es de interés para la industria de los alimentos, cosmetología y farmacéutica (Auerbach y Gray, 1999), ya que estos compuestos tienen la capacidad de donar electrones o atrapar radicales libres.

En el laboratorio de fermentaciones sólidas (planta piloto 4) de la UAM-Iztapalapa se han realizado estudios relacionados con el aprovechamiento de subproductos del café.

Gutiérrez-Sánchez y col. (2000) estudió la capacidad de cepas de hongos filamentosos para degradar la cafeína presente en una infusión de café. *Penicillium commune* V33A25 presentó el mayor porcentaje de degradación de cafeína (96%). El uso del medio líquido como modelo de estudio, contribuyó al diseño, implementación y operación de bioprocesos que mejoren la calidad nutricional de la PC

Ruiz-Sánchez y col. (2002) realizaron la producción de cafeoil, feruloil y *p*-cumaroil esterasas con *A. niger* Aa20, *A. awamori* NRRL 3112 y *Penicillium commune* V33A25 en diferentes fuentes de carbono como cereal y PC. La producción de la cafeoil esterasa I se indujo al usar la PC ensilada y el trigo. La producción de feruloil esterasa se

indujo por la combinación de xilano de avena y ácido ferúlico. La producción de *p*-curamoil esterasa se indujo al usar pulpa de remolacha, el salvado de trigo y la PC ensilada.

Nava-Villagómez y col. (2003) evaluaron las condiciones ambientales y el pre-tratamiento de la PC para su uso en FMS con *P. commune* a nivel semi-piloto. El tratamiento térmico no debe exceder un valor de 1272 KJ/kg de PC, para favorecer el crecimiento de *P. commune*. El mezclado de los sólidos, después de la germinación de las esporas, redujo la temperatura de la PC y la producción de CO<sub>2</sub>.

Por su parte Pérez-Morales y col. (2008) produjeron y caracterizaron un extracto enzimático con actividad feruloil esterasa y pectinasa a partir de un hongo filamentoso por FMS utilizando como sustrato PC. Las condiciones de cultivo que favorecieron la producción de actividad enzimática fueron obtenidas al utilizar una proporción de medio de cultivo al 50% (Asther y col., 2002), incubando a 30 °C durante 36 horas con una humedad del 65%.

Arellano-González y col. (2009) evaluaron la capacidad antioxidante de la PC antes y después de ser fermentada con *A. tamaritii*. Los extractos de PC fermentada presentaron mejor capacidad antioxidante aunque tuvieron una menor cantidad de compuestos fenólicos totales, debido a la acción enzimática de *A. tamaritii* sobre la pared celular y que a su vez parte de los AH liberados fueron metabolizados por el mismo hongo.

Baqueiro-Peña y col. (2010) estudiaron la biotransformación de los AH presentes en la PC por cepas del género *Aspergillus* y *Penicillium*. El cultivo sólido mostró ser una herramienta interesante en el proceso de biotransformación del AF en 4-vinilguayacol que tiene un valor de 40 veces mayor que el AF y que es ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica.

El trabajo de Maestría previo al presente “Extracción enzimática de ácidos hidroxicinámicos presentes en la pulpa de café”, el objetivo fue extraer los AH de la pared celular de la PC por medio de pectinasas que degradaran la pared celular de la PC y extractos lipolíticos que exhibieran la actividad de la FAE producidos por FMS. El tratamiento sucesivo con 10 UI<sub>pectinasa</sub> y 10 UI<sub>FAE</sub> proveniente de *R. pusillus* (23aIV) tuvo la

mayor eficiencia de extracción de los AH covalentemente unidos a la pared celular de la PC: 45% del ACI, 2.7% del AC y 25.5% del AF. El ApC no pudo ser extraído con ninguno de los tratamientos probados.

Además, se determinó la cantidad de AH en la PC como sigue (mg/kg de PC): ACI,  $3097 \pm 3.5$ ; AC,  $1\ 985 \pm 3.6$ ; AF,  $113 \pm 4.7$  y ApC,  $81 \pm 6.0$ . Las cantidades de AH se encontraron en el intervalo de lo reportado por Benoit y col., Roussos y col. y Labat y col. En el trabajo se reportó por primera vez la cantidad de AH no covalentemente unidos a la pared celular de la pulpa de café, teniendo un 23.1% de ACI, un 26.6% de AF y un 5.6% de AC en forma libre, más del 80% de los AH se encontraron esterificados a la pared celular de la PC (Torres-Mancera y col., 2010).

Lo aprendido en este trabajo experimental realizado en la maestría nos mostró el potencial de usar enzimas producidas por FMS que tuvieran la capacidad de liberar compuestos fenólicos como los AH de la pared celular. Además nos llevó a concluir que para mejorar la eficiencia de extracción de estos compuestos antioxidantes con alto valor agregado era necesario que el extracto enzimático presentara diversas actividades enzimáticas (esterasa, pectinasa, xilanasa, celulasa), cuidando que no se tenga en el extracto enzimático en mayor medida enzimas que hidrolicen el producto de interés como es el caso del ACI, ocasionando pérdidas en la extracción.

## 4 JUSTIFICACIÓN

El beneficio húmedo de la cereza del café genera residuos que pueden convertirse en un problema para el ambiente si no son tratados adecuadamente. En el 2008 se estima que en México se produjeron cerca de 71 millones de toneladas de PC por beneficio húmedo (INEGI, 2009). La disposición inadecuada de la PC, que es un residuo rico en azúcares y pectina, provoca un problema importante de contaminación, debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y su rápida fermentación. Cuando es depositada sobre terrenos o ríos, produce malos olores y fauna indeseable. Sin embargo, la PC contiene compuestos de alto valor agregado que pueden ser extraídos como es el caso del ACI, cuya concentración se encuentra alrededor de 3 mil mg/kg (Torres-Mancera y col., 2011).

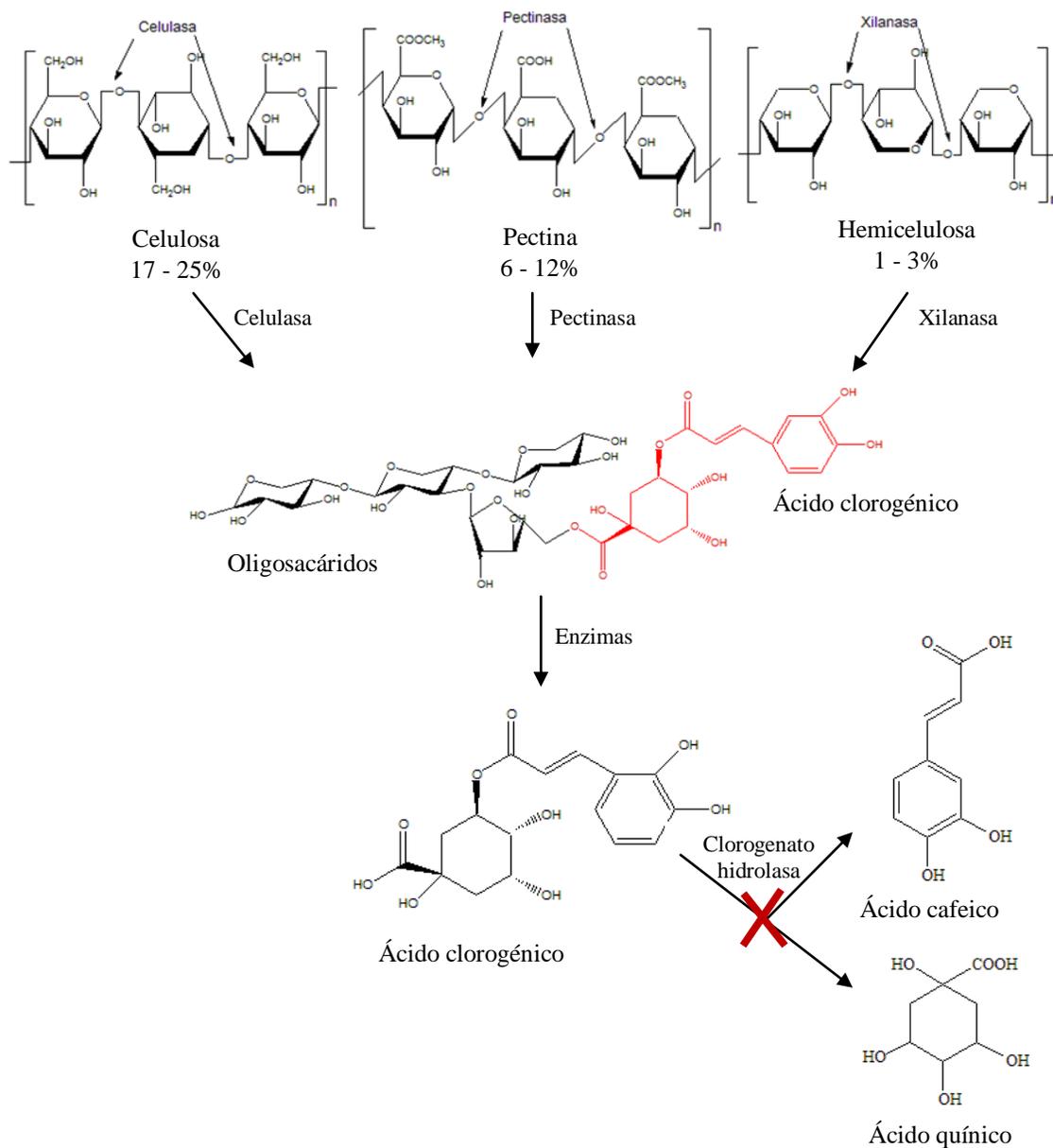
El ACI es utilizado en diferentes actividades farmacológicas, como anti-oxidante, anti-viral, anti-bacterial y anti-fúngico con baja toxicidad, regulador de la glucemia y siendo quizás lo más relevante, su utilización como materia prima para la elaboración de las vacunas contra la gripe A. En el mercado internacional el ACI está en forma de producto grado analítico, grado alimenticio y a granel. Se comercializa como ingrediente alimenticio para ser incorporado al tratamiento de reducción de peso corporal. China es el país exportador de ACI más importante, lo extrae de vegetales del género *Eucommia*, el precio varía dependiendo de la aplicación y el grado de pureza.

El análisis económico realizado muestra que las utilidades que se pueden obtener por tonelada de ACI representa el 94.3% de las utilidades, seguido del AC con un 0.59% y el AF con un 0.033%. La cafeína representa 4.35% de las utilidades.

La extracción enzimática del ACI en comparación con otros métodos de extracción, resulta selectiva, económica y no nociva para el medio ambiente, permitiendo obtener un producto natural. Actualmente no se tiene un método adecuado y estandarizado de extracción enzimática del ACI. Considerando la cantidad de ACI presente en la PC y que es un producto de alto valor agregado resulta atractivo económicamente extraerlo enzimáticamente de residuos agro-industriales como la PC.

## 5 HIPÓTESIS

El empleo de un extracto enzimático con múltiples actividades enzimáticas despolimerizantes (pectinasa, xilanasa y celulasa) mejorarán la eficiencia en la extracción del ácido clorogénico esterificado. Las enzimas hidrolizarán los polisacáridos de la pared celular de la pulpa de café facilitando la extracción del ácido clorogénico. Deberá evitarse la producción de alguna esterasa que hidrolice el ácido clorogénico para recuperar la mayor cantidad del mismo. Esta hipótesis se esquematiza en el siguiente diagrama.



## 6 OBJETIVOS

### 6.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar una estrategia para la obtención de un extracto enzimático que presente diversas actividades despolimerizantes y desterificantes que permitan extraer compuestos con un alto valor agregado como el ácido clorogénico que se encuentra esterificado a la pared celular de la pulpa de café.

### 6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar métodos cuantitativos y efectivos para la evaluación de las actividades enzimáticas: pectinasa, xilanasas, celulasa y clorogenato esterasa.
- Desarrollar un sistema innovador de medición de la respirometría para FMS capaz de medir CO<sub>2</sub> (%), O<sub>2</sub> (%), flujo másico en diversos canales y ser operado remotamente.
- Pre-seleccionar las cepas fúngicas que presenten un índice de potencia mayor a 1 en cajas Petri con pectina, xilano y carboxi metil celulosa y con menor o nula actividad de la clorogenato esterasa.
- Seleccionar las cepas fúngicas cuyos extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido sean capaces de extraer el ácido clorogénico sin hidrolizarlo usando pulpa de café como soporte/sustrato.
- Determinar mediante un diseño experimental el efecto de las actividades enzimáticas despolimerizantes (pectinolítica, xilanolítica, celulólitica) sobre la extracción del ácido clorogénico esterificado a la pulpa de café.
- Establecer las condiciones óptimas de cultivo (fuente de carbono y nitrógeno, micronutrientes, temperatura, tamaño de partícula) que permitan obtener un extracto enzimático que presente las actividades enzimáticas necesarias para extraer el ácido clorogénico esterificado en la pulpa de café y evitar la producción de la clorogenato esterasa.
- Evaluar la eficiencia de extracción del ácido clorogénico esterificado de la pulpa de café con el extracto enzimático crudo producido por fermentación en medio sólido en las condiciones optimizadas.

## 7 MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se presentan los materiales y métodos empleados para el cumplimiento de los objetivos particulares planteados. El capítulo se divide en: Microorganismos y conservación, soporte/sustrato, estrategia experimental, condiciones de cultivo, tratamiento de las muestras, técnicas analíticas, técnicas desarrolladas en este trabajo, sistema de respirometría desarrollado, diseño de experimentos y análisis estadístico.

### 7.1 MICROORGANISMOS

#### 7.1.1 Microorganismos y conservación

Se estudiaron seis cepas de hongos filamentosos: *Rhizomucor pusillus* (23aIV) *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus niger* (A10, CH4), *Trametes sp.*, y *A. tamaritii* (V12307). *Rhizomucor pusillus* fue donada por el Dr. Jesús A. Córdova López (Laboratorio de Bioprocesos) de la Universidad de Guadalajara, *Aspergillus niger* (CH4) fue donada por Carlos Huitrón, IIBM de la UNAM, las demás cepas forman parte de la colección UAM-IRD.

Las cepas se cultivaron en tubos de ensayo con 10 ml de medio Agar Papa Dextrosa (PDA), se incubaron a 30°C por 5 días, una vez que el cultivo esporuló se almacenaron a 4°C hasta su uso. La conservación a largo plazo de las cepas se realizó preparando viales con sílica.

#### 7.1.2 Producción del inóculo y conteo de esporas

Las 6 cepas se sembraron en tubos de ensayo con 10 ml de PDA, se incubaron a 30°C por 5 días, que es aproximadamente el tiempo en el que los hongos tardan en esporular. Al final de este periodo a cada tubo de ensayo se le agregó 3 ml de Tween 80 estéril al 0.01% (v:v). Se tomó una alícuota de 500 µl y se agregó a matraces Erlenmeyer con 50 ml de PDA, se incubaron a 30°C por alrededor de 5 días hasta que las cepas esporularon. El inóculo se obtuvo colectando las esporas de los matraces Erlenmeyer con 15 ml de Tween 80 estéril al 0.01% (v:v).

El conteo de esporas se realizó en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio de contrastes (Olympus BX40). Se tomó 1 ml de la suspensión y se distribuyó en los canales de la cámara. Con el objetivo 40x se efectúa el conteo de esporas al azar de 10 cuadros de la cámara para después calcular el número de esporas/ml del inóculo.

$$N = E * D * 1 \times 10^4$$

*N*: Número de esporas/ml

*E*: Promedio de esporas de los 25 cuadros

*D*: Factor de dilución

## **7.2 SOPORTE/SUSTRATO**

### **7.2.1 Origen y tratamiento de la pulpa de café**

La pulpa de café (PC) se obtuvo del “Beneficio de Café Finos” localizado en Coatepec Veracruz, perteneciente a la empresa Agroindustrias Unidas de México S.A. de C.V., grupo que está incorporado al Congreso Regulador del Café en el Estado de Veracruz. Se colectó directamente del despulpador del beneficio húmedo del procesamiento de la cereza de café de la variedad *Coffea arabica*. La PC colectada presentó entre un 82% y 90% de humedad y se transportó en un camión durante la noche hasta la UAM-I donde para su conservación se secó al sol y a 60°C por 48 h hasta tener una humedad del 3%.

Se limpió manualmente de basuras como hojas, granos de café, ramas, tegumento etc. La PC se molió con una licuadora y tamizó a través de las mallas 12, 16 y 20 obteniendo tamaños de partícula de 1.68, 1.19 y 0.8 mm, respectivamente. Posteriormente las fracciones se almacenaron por separado en un lugar seco y en la obscuridad hasta su uso.

### **7.2.2 Origen y tratamiento del orujo de olivo**

El orujo de olivo (OO) provino de la región de Tadla-Azilal, Marruecos. Se colectó directamente después de la molienda del fruto de olivo para la extracción del aceite. El GO

colectado presentó una humedad del 35%, en el lugar se para su conservación se secó a 60°C por 48 h hasta tener una humedad del 5%

El GO seco se traslado a la Universidad de Paul Cezanne en Marsella Francia en donde se tamizó a través de las mallas 12, 16 y 20 obteniendo tamaños de partícula de 1.68, 1.19 y 0.8 mm, respectivamente. Posteriormente las fracciones se almacenaron por separado en un lugar seco y en la obscuridad hasta su uso.

### **7.3 CONDICIONES DE CULTIVO**

#### **7.3.1 Índice de potencia**

##### Cajas Petri con pectina, xilano, CM-celulosa

Se preparó medio de cultivo con 2 g/L de pectina, xilano ó CM-celulosa y 15 g/L de agar. Se colocó en baño María hasta que ebulló por 1 min. Se esterilizó por 15 min, 15 lb y 121°C y se vaciaron 10 ml de medio en cajas Petri de 5 cm de diámetro en condiciones asépticas (Antier y col., 1993).

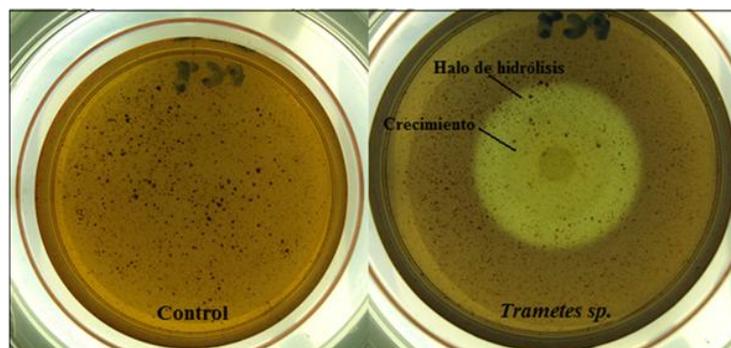
##### Cajas Petri con ácido clorogénico

Se preparó medio de cultivo con 0.5 g/L de ACI y 15 g/L de agar. Se puso en baño María hasta que ebulló por 1 min. Se esterilizó por 15 min, 15 lb y 121°C y se vaciaron 10 ml de medio en cajas Petri de 5cm de diámetro en condiciones asépticas.

##### Cajas Petri con PC y PCT

La PC fue molida hasta un tamaño de malla 100. Una parte de la PC se trató agregando metanol en una relación 1 g PC por 3 ml de metanol, se agitó por 5 min y centrifugó por 10 min a 5000 rpm. La pulpa de café tratada (PCT) se secó a 60°C por 48 h. Se preparó un medio de cultivo con 2 g/L de PC o PCT y 15 g/L de agar. Se puso en baño María hasta que ebulló por 1 min. Se esterilizó por 15 min, 15 lb y 121°C y se vaciaron 10 ml de medio PC y PCT en cajas Petri de 5 cm de diámetro en condiciones asépticas.

A cada caja Petri con medio PC, PCT, pectina, xilano, CM-celulosa y ácido clorogénico, se le agregó 3 µl de una suspensión de esporas con una concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/ml de cada hongo filamentoso en condiciones estériles. Se incubaron a 28°C (*T. harzianum*), 30°C (*A. niger* A10 y CH4, *A. tamarii*), 37°C (*Trametes* sp.) y 40°C (*R. pusillus*) por 26 h y 43 h, esto se hizo por duplicado. Los blancos no fueron inoculados. Al término del periodo de incubación se agregaron 5 ml de lugol (12 h). La solución contiene yodo diatómico I<sub>2</sub> (1%) en equilibrio con yoduro de potasio KI (2%) en agua destilada. Posteriormente se midieron los diámetros de los halos de hidrólisis. Se agregó 5 ml de azul de algodón al 0.5% y se midieron los diámetros de las colonias (Figura 7.1).



**Figura 7.1.** Representación esquemática del halo de hidrólisis y diámetro de la colonia de *Trametes* sp. en cajas Petri con PCT

Se determinó el índice de potencia (IP) de cada una de las cepas en las cajas Petri con los diferentes medios. El IP es una relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia del microorganismo, que nos muestra cuantas veces es más grande el diámetro del halo de hidrólisis con respecto al diámetro de la colonia. La actividad hidrolítica es directamente proporcional al  $IP > 1$  (Herrera, 2003; Antier y col., 1993).

$$IP = \frac{DAH}{DC}$$

*IP*: Índice de potencia

*DAH*: Diámetro del halo de hidrólisis

*DC*: Diámetro de la colonia

### 7.3.2 Estimación de la hidrólisis del ácido clorogénico en tubos de ensayo

Se preparó un medio de cultivo con 0.1 g/L de ACI, se vaciaron 3 ml del medio en tubos con rosca y se esterilizaron por 15 min, 15 lb y 121°C. Se inoculó con  $1 \times 10^8$  esporas/ml y se incuban a 28°C (*T. harzianum*), 30°C (*A. niger* A10 y CH4, *A. tamarii*), 37°C (*Trametes* sp.) y 40°C (*R. pusillus*) por 36 h. Después de 36 h de incubación se filtraron las muestras y se analizaron por el HPLC.

### 7.3.3 Fermentación en matraces: pulpa de café

En un vaso de precipitados de 250 ml se agregaron 50 g de PC seca, se agregaron 4 ml de agua destilada y se esterilizó por 15 min a 110°C. Una vez que se esterilizó se mezclaron en condiciones asépticas, se inoculó con  $1 \times 10^8$  esporas/g de PC y se agregó el agua restante para tener una humedad del 60%. La PC húmeda (PCH) se distribuyó en matraces de 125 ml, cada matraz tenía 10 g de PCH. Los matraces se incubaron a 30°C (*A. niger* CH4, *A. tamarii*), 37°C (*Trametes* sp.) y 40°C (*R. pusillus*). Se realizaron varios muestreos durante la fermentación cada 5, 10 y 12 horas según se requiriera. Inmediatamente después de retirar la muestra de la incubación, los matraces fueron refrigerados por un tiempo no mayor de 12 h; posteriormente, el contenido se deshidrató, hasta tener una humedad del 3% en la PCF. A cada muestra se le determinó los azúcares reductores liberados, la actividad pectinasa, FAE y CIE, la cantidad de ACI liberado y esterificado en la PCF.

### 7.3.4 Fermentación en columnas: pulpa de café

En un vaso de precipitados de 250 ml se colocaron 20 g de PC, se hidrató con 15 ml de agua destilada y se esterilizó por 15 min a 110°C. Una vez a temperatura ambiente se mezclaron en condiciones asépticas con 15 ml del medio de Asther y col. (2002) al 50% reportado para promover la producción de FAE y se agregó agua restante para tener una humedad del 60%. Se inóculo con  $1 \times 10^8$  esporas/g de PC. Los 50 g de PCH (60%) se distribuyeron asépticamente en 3 columnas de fermentación de 2 cm de diámetro interno. La densidad de la PC húmeda bajo estas condiciones de ensayo fue de  $0.333 \text{ g/cm}^3$ . Las columnas se incubaron en baño de agua a 30°C (*A. niger* CH4, *A. tamarii*), 37°C (*Trametes*

sp.) y 40°C (*R. pusillus*), el flujo fue de 2 VKgM. Inmediatamente después de sacarse del baño de incubación, las columnas se refrigeraron por un tiempo no mayor de 12 h; posteriormente, el contenido de las columnas se deshidrató con una corriente de aire seco a 10 L/min por columna, hasta una humedad del aire a la salida constante. El crecimiento del microorganismo se monitoreó indirectamente por la producción de CO<sub>2</sub> (Saucedo-Castañeda y col., 1994). A cada muestra se le determinó la actividad FAE, la cantidad de ACI libre y esterificado.

### **7.3.5 Diseño Plackett-Burman**

Se estudió el efecto de los factores como: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, micro-nutrientes, temperatura y tamaño de partícula en la producción de enzimas despolimerizantes en medio de cultivo sólido. Cada uno de los ensayos se realizó por duplicado. Cada ensayo tenía 20 g de soporte sustrato: 1/3 de PC, 1/3 de orujo de olivo (OO), 1/3 de bagazo de caña (BC), se esterilizó por 15 min a 110°C. El soporte sustrato (SS) fue inoculado con  $1 \times 10^8$  esporas/g de SS, tenía una humedad del 60% y una aireación de 2 VKgM. Terminado el periodo de incubación las columnas se refrigeraron por un tiempo no mayor de 12 h; posteriormente, el contenido de las columnas se deshidrató con una corriente de aire seco a 10 L/min por columna, hasta una humedad del aire a la salida constante. El crecimiento del microorganismo se monitoreó indirectamente por la producción de CO<sub>2</sub> (Saucedo-Castañeda y col., 1994). A cada muestra se le determinó la actividad pectinolítica (APec), xilanolítica (AXil), celulolítica (ACel) y CIE, humedad, actividad de agua.

Los factores y niveles estudiados en el diseño tipo Plackett-Burman se presentan en la Tabla 7.1.

**Tabla 7.1.** Factores del diseño experimental tipo Plackett-Burman

Factores	Concentración (100g SS)	
	-	+
Fuente de Carbono	x <sub>1</sub> Sacarosa	1g 6g
	x <sub>2</sub> Maltosa	1g 6g
Micro-nutrientes	x <sub>3</sub> Solución Oligoelementos	0.1ml 1ml
Fuente de Nitrógeno	x <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5g 2g
	x <sub>5</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5g 2g
Temperatura	x <sub>6</sub> Temperatura	30°C 40°C
Tamaño de partícula	x <sub>7</sub> Tamaño de partícula	Malla 12 Malla 20

La solución de oligoelementos presentó la siguiente composición (g/L): ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.29; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.17; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 1.47; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1.5; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.62.

### 7.3.6 Diseño factorial central compuesto

En un vaso de precipitados de 250 ml se colocaron 20/3 g de PC, 20/3 g GO y 20/3 g BC los cuales se impregnaron con cada uno de los medios (M1-M16) propuestos en el diseño central compuesto. Se agregó a cada ensayo por cada 100 g de SS: maltosa, 3.5 g; solución de oligoelementos, 0.55 ml, se inoculó con  $1 \times 10^8$  esporas y se agregó agua destilada hasta tener una humedad del 60%, el tamaño de partícula fue malla 16. La materia húmeda se distribuyó en 2 columnas de fermentación de 2 cm de diámetro interno. Las columnas se incubaron a 35°C con un flujo de 2 VKgM. Las muestras tomadas durante la fermentación fueron almacenadas a 4°C. El crecimiento del microorganismo se monitoreó indirectamente por la producción de CO<sub>2</sub> con un equipo construido en la PP4 (ver sección 7.9). Por cada muestra se obtuvo un extracto enzimático crudo al que se le determinó la APec, AXil, ACel y CIE.

En la Tabla 7.2 se muestran los niveles para cada uno de los factores ensayados en el diseño central compuesto con un nivel de variación de 1.5 unidades.

**Tabla 7.2.** Niveles reales y codificados de los factores del diseño factorial central compuesto

Factores			Concentración (g/100g SS)				
			1.41	1	0	-1	-1.41
Fuente de Carbono	A	Sacarosa	7.1	6.5	5.0	3.5	2.9
Fuente de Nitrógeno	B	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.9	3.5	2.5	1.5	1.1
	C	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.9	3.5	2.5	1.5	1.1

### 7.3.7 Validación de la optimización

Se prepararon 50 g de SS con 1/3 g de PC, 1/3 g GO y 1/3 g BC malla 16. Se impregnaron con medio de cultivo (g por cada 100 g de SS): maltosa, 3.5 g; solución de oligoelementos, 0.55 ml, sacarosa, 5.5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.8 y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.6. Se inoculó con  $1 \times 10^8$  esporas y se agregó agua destilada hasta tener una humedad del 65%. La materia húmeda se distribuyó en 3 columnas de fermentación de 2 cm de diámetro interno. Las columnas se incubaron a 35°C con un flujo de 2 VKgM. Las muestras tomadas durante la fermentación fueron almacenadas a 4°C. El crecimiento del microorganismo se monitoreó indirectamente por la producción de CO<sub>2</sub> con un equipo construido en la PP4 (ver sección 7.8). Por cada muestra se obtuvo un extracto enzimático crudo al que se le determinó la APec, AXil y CIE.

## 7.4 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

### 7.4.1 Extracción del ácido clorogénico total: hidrólisis alcalina

Se pesó 1 g de PC o PCF seca se depositó en tubos de centrífuga de 60 ml con 5 ml de NaOH 1M, a los blancos se les agregaron 5 ml de agua destilada. La hidrólisis se llevó a cabo en la oscuridad a 30°C por 4 h a 100 rpm (Naczki y Shahidi, 2004). Al término del tiempo de hidrólisis se agregó ácido clorhídrico, hasta que se alcanzó aproximadamente un pH de 3, se dejó en la oscuridad por 5 minutos. Posteriormente, se le agregaron 3 ml de acetato de etilo, se agitó por 5 min a 100 rpm y se centrifugó por 10 min a 5 000 rpm, esto

se realizó por cuadruplicado. Se recuperó la fase orgánica que es donde se encuentra el ACI, por último se tomaron 500  $\mu$ l de la fase orgánica se filtraron a través de un filtro de 45 $\mu$ m para su análisis por HPLC.

#### **7.4.2 Extracción del ácido clorogénico libre**

A la PC o PCF se le realizó una extracción con metanol/agua 80:20 (v:v). Se pesó 1 g de PC seca y se depositó en tubos de centrífuga de 60 ml con 5 ml de una solución de metanol/agua. La extracción se llevó por 1 h a 100 rpm y 40°C. Después se centrifugaron por 10 min a 5000 rpm por decantación se separó el solvente. Se tomaron 500  $\mu$ l del sobrenadante se filtraron a través de un filtro de 45  $\mu$ m para su análisis por HPLC (20  $\mu$ L).

#### **7.4.3 Determinación del ácido clorogénico biotransformado**

El ACI biotransformado se determinó por una hidrólisis alcalina (ver sección 7.4.1) y por la cantidad de ACI libre (ver sección 7.4.2) presente en la PCF. Además se determinó la cantidad de AH presentes en cada una muestras analizadas.

#### **7.4.4 Obtención del extracto enzimático**

El extracto crudo obtenido a partir de la materia fermentada (MF) de cada una de las cepas se extrajo en presencia de una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 5 y 4°C, con una relación biocatalizador/solución amortiguadora 1:5. Posteriormente, se centrifugó en un equipo BECKMAN COUTLER (Allegra<sup>TH</sup> 25R Centrifuge) por 20 min a 5000 rpm (4°C), para después ser filtrado a través de un papel Whatman no. 41, se realizó un lavado con agua destilada. Los sobrenadantes obtenidos fueron separados en tubos y guardados a 4°C hasta su uso. Los blancos presentaron el mismo tratamiento excepto la presencia del extracto crudo.

#### **7.4.5 Extracción enzimática del ácido clorogénico: diseño de mezclas**

Se estudio el efecto de las enzimas pectinasa, xilanasa y celulasa en la extracción del ACI en la PC seca. Se evaluaron valores de actividad enzimática de 0 a 200 U para las actividades pectinasa, xilanasa y celulasa. Los ensayos se hicieron por triplicado. Las

mezclas tenían 5 g de PC seca (malla 100), 15 ml de agua y 5 ml de amortiguador de fosfatos 100mM pH 5 con la mezcla de enzimas. La extracción enzimática del ACl se realizó a 40°C por 8 h y 100 rpm. Al finalizar el periodo de reacción se congelaron los ensayos por 4 horas para luego ser filtrados y realizar 2 lavados con 4 ml de acetato de etilo para extraer el ACl liberado.

#### **7.4.6 Extracción enzimática del ácido clorogénico en la pulpa de café**

La PC fue pre-tratada con metanol-agua al 80% para extraer el ACl libre. La extracción enzimática del ACl se realizó con 10 g de PC los cuales fueron mezclados con 90 ml de un amortiguador de citratos 50 mM, pH 5 y 10 ml del extracto enzimático obtenido por FMS. La PC y la solución amortiguadora fueron esterilizados por 10 min a 10 psi. Se adicionó 0.2% de cefalosporina (J.T. Baker, México) para prevenir el crecimiento bacteriano durante la reacción enzimática. La extracción enzimática se realizó en la oscuridad, a 40°C, con agitación continua a 100 rpm por 8 h. La extracción se detuvo en frío y se realizó una extracción selectiva del ACl con acetato de etilo en una proporción 1:1 (v:v), a la fase orgánica se le agregó sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para eliminar el agua residual. Finalmente, se midió la cantidad de ACl por HPLC (Bartolomé y Gómez-Cordovés, 1999).

### **7.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS**

#### **7.5.1 Actividad feruloil esterasa**

La actividad de la FAE se midió a partir de 900  $\mu\text{l}$  de una solución 4 mM de metil ferulato. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático crudo, la reacción enzimática se llevó a cabo a 45°C por 25 min, la reacción se detuvo agregando 1 ml de metanol, después se realizó una dilución agregando 8 ml de agua destilada. La aparición del ácido ferúlico se midió por HPLC a 290 nm. La actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de AF por minuto en las condiciones de reacción.

### 7.5.2 Actividad pectinasa, xilanasa y celulasa

Se prepararon soluciones al 1% de pectina, xilano y CM-celulosa, respectivamente. La reacción enzimática se realizó en tubos de ensaye de la siguiente manera: a 1.9 ml de solución de pectina, xilano ó CM-celulosa se le agregó 100 µl de extracto enzimático crudo, se incubó a 45°C por 25 min. La reacción se paró agregando 1 ml de DNS, se colocó en baño a ebullición por 10 min y los tubos se enfriaron con agua fría. Se agregó 7 ml de agua destilada y se leyó la absorbancia a 575 nm determinando la cantidad de azúcares reductores liberados por el extracto enzimático. Una unidad de actividad (U) se definió, como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de ácido galacturónico, xilosa o glucosa, respectivamente por minuto a las condiciones ensayadas (FNP 52, 2000).

### 7.5.3 Cromatografía de gases

El gas de salida de las columnas de la FMS se analizó en un cromatógrafo de gases (GOW-MAC 580) el cual presentó una temperatura de 80°C en el inyector y detector (conductividad térmica), de 50°C para el horno. Se uso una columna empacada Alltech y un flujo de 40 ml/min de helio (Saucedo-Castañeda y col., 1994).

### 7.5.4 Cromatografía de alta resolución: HPLC

Los equipos de HPLC que se utilizaron en este trabajo fueron: 1) HPLC Perkin Elmer LC 250 (binary LC pump), el cual cuenta con un detector Perkin Elmer UV/VIS LC 290; 2) Shimadzu Liquid Chromatograph LC20A (quaternary pump), el cual cuenta con un detector de arreglo de diodos SPD M20A. El tamaño de la muestra que se inyectó a ambos equipos fue de 20 µL, la separación se realizó en una columna VARIAN Polaris 5 Amide C18 de 200 × 4.6 mm.

#### HPLC para los tubos con ácido clorogénico

Los estándares y las muestras se corrieron a un flujo de 0.8 ml/min y una temperatura de 35°C. Las fases móviles fueron A: metanol y B: agua. Las muestras se corrieron de manera isocrática por 10 min en una relación A:B 60:40 (v:v). De manera simultánea se monitorearon los picos a las longitudes de onda 290 y 320 nm.

### HPLC para las muestras de PC y SS

Los estándares y las muestras se corrieron a un flujo de 1 ml/min y una temperatura de 35°C. Las fases móviles fueron A: 1% de ácido acético en agua (v:v) y B: metanol. Las muestras se corrieron de manera isocrática por 60 min en una relación A:B 84:16 (v:v). De manera simultánea se monitorearon los picos a las longitudes de onda 290 y 320 nm.

#### **7.5.5 Humedad**

La humedad se midió por gravimetría en una termobalanza MB45, marca OHAUS, por duplicado. Los resultados se expresaron en porcentaje en base húmeda.

#### **7.5.6 Actividad de agua**

La actividad de agua se midió por duplicado en un equipo AquaLab CX-2, Labsen Scientific. El equipo se calibró con agua destilada ajustando el valor de  $a_w$  a 1.

#### **7.5.7 Medición de pH**

El pH se midió en un equipo Conductronic pH-120. La calibración del equipo se realizó con soluciones amortiguadoras estándar pH 4 y 7 (J. T. Baker). Por cada medición realizada el electrodo se enjuagó con agua destilada.

### **7.6 TÉCNICAS DESARROLLADAS EN ESTE TRABAJO**

Durante el desarrollo de este trabajo experimental fue necesario desarrollar algunas técnicas para medir actividades enzimáticas.

#### **7.6.1 Cuantificación de la actividad pectinasa, xilanasa y celulasa en cajas Petri**

Se preparó una solución de 2 g/L de pectina, xilano y CM-celulosa respectivamente con 15 g/L de agar. Se colocó en baño María por 1 min. Se esterilizó por 15 min, 15 lb y 121°C y se vació 10 ml de cada solución o suspensión en cajas Petri con un diámetro de 50 mm en condiciones estériles.

La solución madre se preparó disolviendo 130 U/ml de pectinasa, xilanasa y celulasa comerciales (Sigma-Aldrich, México) por separado en un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 5. Se realizaron 6 diluciones hasta tener una concentraciones de 0.01 a 0.5 U/caja.

Se agregaron 3  $\mu$ l de cada una de las diluciones en el centro de la caja Petri se dejaron reposar por 10 min en condiciones estériles y se incubaron a 30° y 40°C por 24, 48 y 72 horas. Al término del periodo de incubación a las cajas Petri con xilano ó CM-celulosa se les agregaron 5 ml de una solución de lugol con 1% de I<sub>2</sub> y 2% de KI. A las cajas Petri con pectina se les agregaron 5 ml de HTAB al 1%. El rebelado de las cajas se obtuvo después de 12 h.

Las cajas Petri rebeladas se les midió el diámetro del halo de hidrólisis tomando como base los cuatro puntos cardinales y se cálculo el área con la siguiente ecuación:

$$A = \pi \frac{d^2}{4}$$

Donde: A Es el área del halo de hidrólisis (cm<sup>2</sup>);  $\pi$  Es una constante 3.141516;  $d$  Es el promedio de la medición de 2 diámetros usando los 4 puntos cardinales

Se construyó una curva estándar con las áreas calculadas por cada una de las diluciones realizadas para cada una de las enzimas comerciales (pectinasa, xilanasa y celulasa). A partir de la siguiente ecuación fue posible determinar la actividad enzimática presente en los extractos enzimáticos producidos durante la FMS.

$$A = m * C + b$$

Donde: A Es el área del halo de hidrólisis (cm<sup>2</sup>);  $m$  Es la pendiente (cm<sup>2</sup> caja U<sup>-1</sup>);  $C$  Es la concentración de la enzima (U caja<sup>-1</sup>);  $b$  Es la ordenada al origen (cm<sup>2</sup>)

Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1  $\mu$ mol de pectina, xilano o CM-celulosa respectivamente, por minuto.

### 7.6.2 Actividad clorogenato esterasa por espectrofotometría

La actividad de la CIE se midió a partir de 900  $\mu\text{l}$  de una solución madre 2 mM de ACI se agregó 100  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático crudo, la reacción enzimática se llevó a cabo a 40°C por 20 min, la reacción se detuvo agregando 1 ml de metanol, después se realizó una dilución agregando 8 ml de agua destilada. La hidrólisis del ACI se midió a 290 y 320 nm. La actividad CIE se determinó por la presencia de AC e hidrólisis del ACI a partir de la ecuación de la ley de Beer y se corroboró por HPLC (Ralet y col., 1994).

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} b C$$

Donde:

$A_{\lambda}$  La absorbancia a una determinada longitud de onda ( $\lambda$ )

$\epsilon_{\lambda}$  El coeficiente de extinción molar ( $\lambda \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$b$  La longitud de la celda (1 cm)

$C$  La concentración (mM)

La absorbancia que se midió a los 290 y 320 nm es el resultado de la adición de la presencia del AC producido por la hidrólisis del ACI como del ACI no hidrolizado, es así que se planteó lo siguiente:

$$A_{\lambda 1} = \epsilon_{1\lambda 1} C_1 + \epsilon_{2\lambda 1} C_2 \quad (1)$$

$$A_{\lambda 2} = \epsilon_{1\lambda 2} C_1 + \epsilon_{2\lambda 2} C_2 \quad (2)$$

Donde:

$A_{\lambda 1}$  La absorbancia medida a 320 nm

$A_{\lambda 2}$  La absorbancia medida a 290 nm

$\epsilon_{1\lambda 1}$  Coeficiente de extinción molar del ACI a 320 nm

$\epsilon_{2\lambda 1}$  Coeficiente de extinción molar del AC a 320 nm

$\epsilon_{1\lambda 2}$  Coeficiente de extinción molar del ACI a 290 nm

$\epsilon_{2\lambda 2}$  Coeficiente de extinción molar del AC a 290 nm

$C_1$  Concentración del ACI no hidrolizado

## $C_2$ Concentración del AC producido por la hidrólisis del ACI

A partir de la resolución del sistema de ecuaciones 1 y 2 por sustitución se tienen las siguientes ecuaciones con las que se puede calcular la actividad enzimática de la CIE.

$$C_1 = \frac{\epsilon_{2\lambda 2} A_{\lambda 1} - \epsilon_{2\lambda 1} A_{\lambda 2}}{\epsilon_{1\lambda 1} \epsilon_{2\lambda 2} - \epsilon_{2\lambda 1} \epsilon_{1\lambda 2}} \quad (3)$$

$$C_2 = \frac{\epsilon_{1\lambda 1} A_{\lambda 2} - \epsilon_{1\lambda 2} A_{\lambda 1}}{\epsilon_{1\lambda 1} \epsilon_{2\lambda 2} - \epsilon_{2\lambda 1} \epsilon_{1\lambda 2}} \quad (4)$$

Los coeficientes de extinción molar se determinaron a partir de las siguientes ecuaciones que vienen de hacer un arreglo a la ley de Beer.

$$\epsilon_{1\lambda 1} = \frac{A_{\lambda 1}}{C_1} \quad (5) \quad \epsilon_{2\lambda 1} = \frac{A_{\lambda 1}}{C_2} \quad (7)$$

$$\epsilon_{1\lambda 2} = \frac{A_{\lambda 2}}{C_1} \quad (6) \quad \epsilon_{2\lambda 2} = \frac{A_{\lambda 2}}{C_2} \quad (8)$$

La actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un  $\mu\text{mol}$  de AC por minuto en las condiciones de reacción.

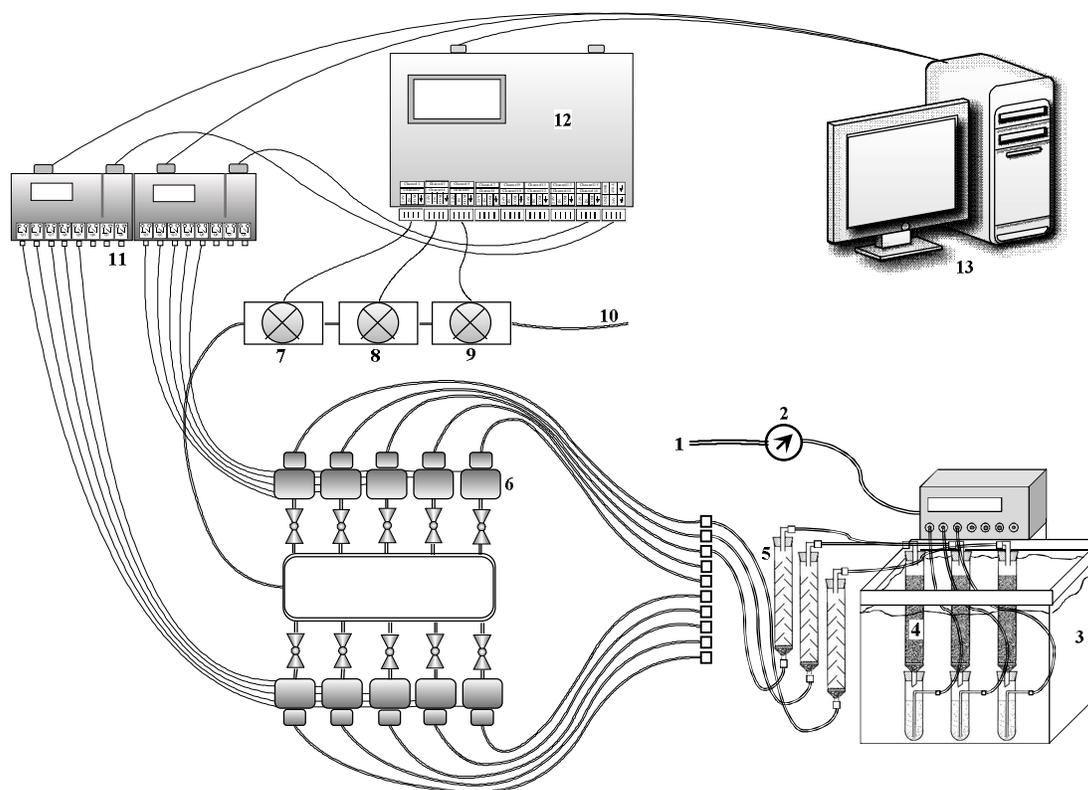
## 7.7 SISTEMA DE RESPIRÓMETRO DESARROLLADO

El presente desarrollo se refiere a un sistema de respirometría que permitió el control y monitoreo en línea y administración remota del consumo de  $\text{O}_2$ , producción de  $\text{CO}_2$  y medición de flujo. En la Figura 7.2 se presenta un diagrama esquemático del sistema de respirometría desarrollado.

El sistema de respirometría cuenta con los siguientes elementos:

- Válvulas solenoides (6)
- Medidor de flujo (7; USA)
- Detector de  $\text{CO}_2$  (8; United Phosphorus, LTD, USA)
- Detector de  $\text{O}_2$  (9; United Phosphorus LTD, USA)

- PLC Controlador lógico programable (11, PROTEC, México)
- Datalogger M6+ (12, PROTEC, México)



**Figura 7.2.** Diagrama esquemático del sistema de respirometro desarrollado. 1: Compresor de aire, 2: Regulador de presión, 3: Baño de agua a temperatura controlada, 4: Columnas de fermentación, 5: Columnas con sílica, 6: Válvulas solenoides, 7: Medidor de flujo, 8: Detector de CO<sub>2</sub> infrarrojo, 9: Detector de O<sub>2</sub>, 10: Venteo, 11: Controlador lógico programable (PLC), 12: Datalogger M6+, 13: Computadora

El sistema de respirometría está constituido por 15 válvulas solenoides (6) que permiten analizar la composición del aire en igual número de corrientes de aire seco. Las válvulas del sistema se abren y se cierran dependiendo de la configuración del PLC (11).

El medidor de flujo (7) es otro elemento que forma parte del sistema de respirometría. Permite analizar el flujo de aire seco a valores de 0 a 300 ml/min. El medidor de flujo (7) trabaja en una corriente de +10 a -10 V, esto es importante ya que el medidor

es conectado al Datalogger (12) el cual traduce la señal eléctrica que está dada en volts a ml/min a partir de una curva de calibración.

El sistema además cuenta con dos detectores uno de CO<sub>2</sub> (8; United Phosphorus, LTD, USA) y otro de O<sub>2</sub> (9; United Phosphorus LTD, USA) para el análisis de la fase gaseosa. El detector de CO<sub>2</sub>, es un detector Infrarrojo que permite cuantificar las concentraciones de este gas de 0 a 30% v/v en la corriente gaseosa. El detector de O<sub>2</sub>, es un detector dispersivo que permite cuantificar concentraciones de este gas de 0 a 25% v/v en la corriente gaseosa.

El detector de CO<sub>2</sub> (8) trabaja en un rango de corriente de -10 a +10V, mientras que el detector de O<sub>2</sub> trabaja en un rango de corriente de 4 a 20 mA. Los detectores de CO<sub>2</sub> (8) y O<sub>2</sub> (9) están conectados al Datalogger (12) el cual traduce la señal eléctrica (volts y mA) a partir de una curva de calibración.

El controlador lógico programable (11, PLC) es otro elemento indispensable en el sistema de respirometría desarrollado. El PLC está conectado vía USB a una PC (13). Este dispositivo controla el sistema de válvulas a partir de secuencias ya construidas con los programas Quick II y SUPERCAD 2005.

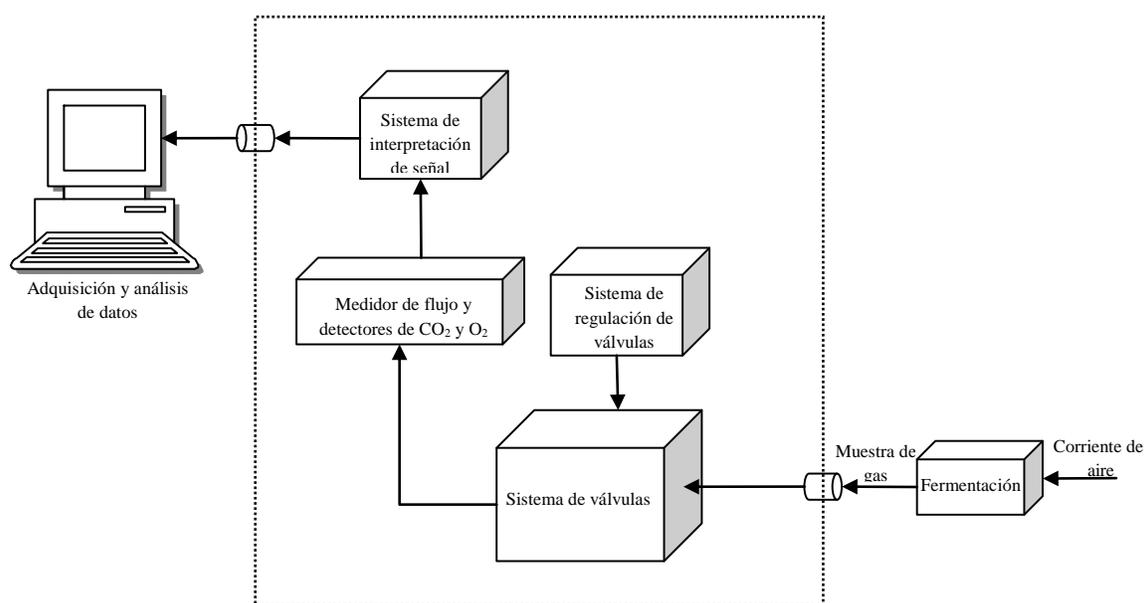
El tiempo de muestreo puede variar según se requiera. Las secuencias no sólo controlan el sistema de válvulas (6) si no también mandan una señal al Datalogger (12) para que inicie la captura de datos de la muestra gaseosa proveniente de la válvula abierta, los cuales son registrados y procesados por el programa LabView. El programa LabView genera una hoja de Excel la cual contiene la siguiente información: fecha, hora, flujo (ml/min), concentración de CO<sub>2</sub> (%), concentración de O<sub>2</sub> (%) y número de válvula.

El Datalogger (12) es otro elemento en el sistema de respirometría, este dispositivo captura, transmite y traduce los datos de las variables medidas por los detectores de CO<sub>2</sub> (8) y O<sub>2</sub> (9) y por el medidor de flujo. Además transfiere los datos al programa LabView para que sean procesados y almacenados en una hoja de Excel. El Datalogger (12) tiene hasta 16 puertos de conexión por lo que tiene la capacidad de albergar hasta 16 sensores

diferentes para determinar por ejemplo la humedad relativa del aire, el contenido de agua en una muestra sólida, temperatura, pH, CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>, entre otros.

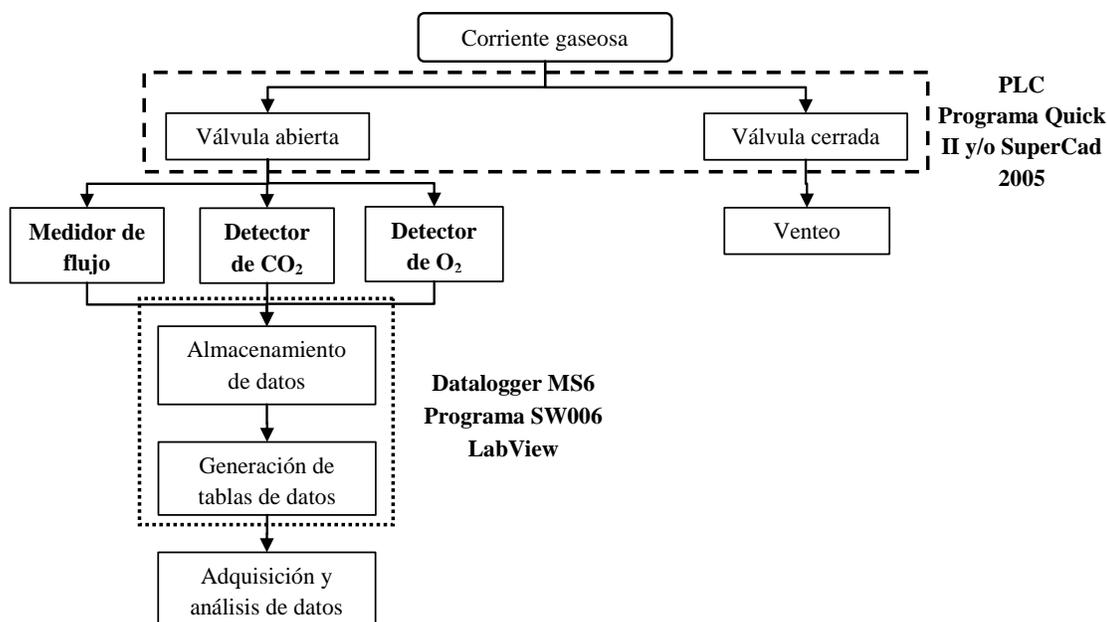
La unión del dispositivo Datalogger (12) con el programa LabView permite que a partir de una dirección IP asignada, los datos del proceso puedan ser vistos remotamente y realizar modificaciones si fuera necesario.

En la Figura 7.3 se tiene un esquema del sistema de respirometría que muestra las etapas que se van desarrollando desde que se tiene las unidades experimentales hasta que se llega a la adquisición y análisis de datos.



**Figura 7.3.** Esquema del funcionamiento del sistema de respirómetro desarrollado

Para explicar con más detalle las actividades que desempeña el sistema de respirometría a continuación (Figura 7.4) se presenta el diagrama esquemático de eventos para una sola válvula.



**Figura 7.4.** Diagrama esquemático de eventos para una sola válvula

La corriente gaseosa proveniente de cada una de las columnas de fermentación o unidades experimentales (4) se deshidrató al hacer pasar el gas a través de columnas de sílica (5). Cada muestra gaseosa entra al equipo a través de cada una de las válvulas solenoide (6; válvula ASCO, USA), cada válvula se abre de manera independiente cada cierto periodo de tiempo (5 min) para analizar el gas proveniente de una columna de fermentación o unidad experimental.

El análisis de la fase gaseosa se realiza con un medidor de flujo (7; USA), un detector de CO<sub>2</sub> (8; United Phosphorus, LTD, USA) y un detector de O<sub>2</sub> (9; United Phosphorus LTD, USA). El medidor y los detectores están estructurados de manera secuencial, el gas que sale del sistema de válvulas (6) pasa primeramente por el medidor de flujo (7) el cual registra el flujo en ml/min. Al ser hermético el medidor de flujo permite que no se pierda la muestra gaseosa y pase al detector de CO<sub>2</sub> (8) el cual registra la concentración porcentual de CO<sub>2</sub> del gas. El detector de CO<sub>2</sub> (8) es hermético por lo que la muestra gaseosa no se pierde y puede pasar por el detector de O<sub>2</sub> (9) el cual registra la concentración porcentual de O<sub>2</sub> del gas, finalmente toda la muestra gaseosa sale por el venteo al ambiente. Después de analizada la muestra gaseosa, la válvula se mantiene cerrada hasta que se haya analizado cada una de las unidades experimentales subsecuentes.

El ciclo de abierto-cerrado de válvulas es controlado por los PCL's (11, PROTEC, México) del sistema que son configurados con ayuda del programa Quick II y/o SuperCad 2005.

El flujo (ml/min) y la concentración (%) de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> analizados en la muestra gaseosa por cada uno de los detectores es adquirida por el Datalogger M6+ (12, PROTEC, México) el cual almacena y genera tablas de datos con ayuda del programa SW006 las cuales pueden ser exportados a Excel para un mejor manejo y análisis de los datos con ayuda del programa LabView.

## **7.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizaron los análisis estadísticos con ayuda de los programas NCSS-2000, SPSS versión 14 y STATISTICA versión 14.

En las siguientes secciones se presentan los resultados obtenidos durante el trabajo experimental desarrollado en el doctorado. Primero se abordan los resultados obtenidos de los ensayos de cuantificación de actividad enzimática en cajas de Petri y por espectrofotometría que se emplearon, así como la evaluación del monitoreo en línea del respirómetro. Posteriormente se presentan los resultados obtenidos en la selección de cepas, optimización de la extracción enzimática del ACl y extracción enzimática del ACl.

## 8 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

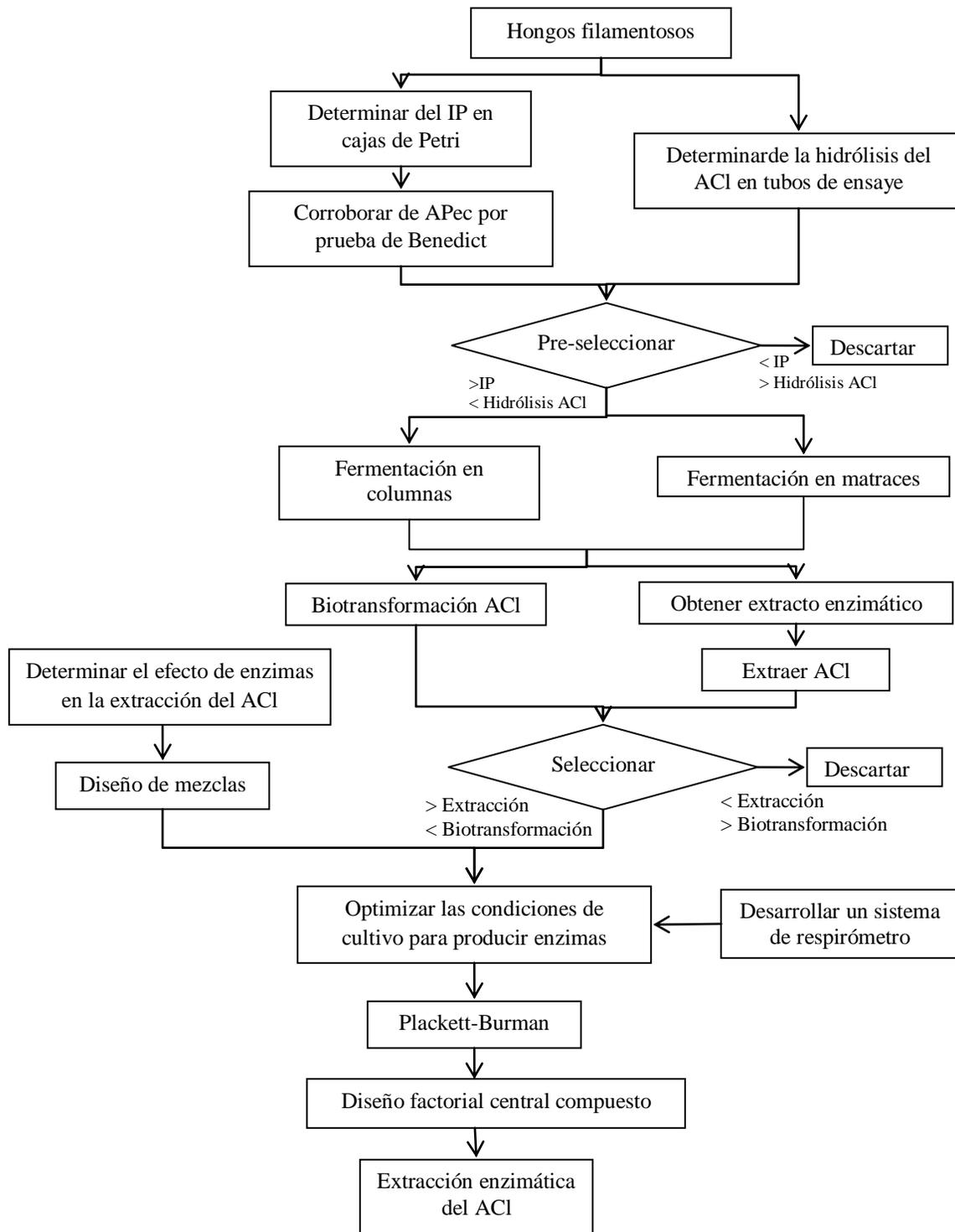
La preselección de las cepas se realizó determinando el índice de potencia en los medios con pectina, xilano y CM-celulosa y la capacidad de las cepas de hidrolizar el ACI.

La selección de las cepas se realizó determinando si las cepas de hongos filamentosos preseleccionadas eran capaces de crecer en PC. Las cepas fueron seleccionadas de acuerdo a su capacidad de extraer el ACI esterificado de la PC y su baja capacidad de hidrolizar el ACI.

Se utilizó el diseño de mezclas para determinar el conjunto de actividades enzimáticas despolimerizantes (pectinasa, xilanasas y celulasa) que debían de estar presentes en el extracto enzimático para tener una mejor eficiencia de extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC.

Las condiciones de cultivo como: fuente de carbono, fuente de nitrógeno, micronutrientes, temperatura y tamaño de partícula, requeridas para tener un extracto enzimático con las actividades despolimerizantes deseables para extraer el ACI y que se inhibiera la producción de la enzima CIE fueron determinadas a partir del diseño experimental tipo Plackett-Burman y el diseño central compuesto. Con el extracto enzimático producido por FMS con las condiciones de cultivo optimizadas se prosiguió a realizar la extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC.

En la Figura 8.1 se presenta el diagrama de flujo del procedimiento general seguido para alcanzar el objetivo planteado en este trabajo que fue extraer de manera enzimática compuestos con alto valor agregado como el ACI que se encuentra esterificado a la pared celular de la PC.



**Figura 8.1.** Diagrama de la estrategia experimental seguida para alcanzar los objetivos planteados

A continuación se presentan los resultados los cuales están organizados en cuatro bloques. En el capítulo 9 se presentan el desarrollo de metodología (enzimática y de respirometría) para alcanzar el cumplimiento de los objetivos, éste se subdivide en la cuantificación de la actividad enzimática en cajas de Petri y por espectrofotometría y la evaluación del monitoreo en línea del respirómetro.

El capítulo 10 presenta la pre-selección de las cepas fúngicas en base a su índice de potencia en cajas Petri con PC, PCT, pectina, xilano y carboxi metil celulosa y su poca o nula actividad de la clorogenato esterasa y la selección de las cepas fúngicas cuyos extractos enzimáticos producidos por fermentación en medio sólido fueron capaces de extraer el ácido clorogénico sin hidrolizarlo usando pulpa de café como soporte/sustrato.

El capítulo 11 presenta la determinación del efecto de las actividades enzimáticas despolimerizantes (pectinolítica, xilanolítica, celulólitica) con enzimas comerciales sobre la extracción del ácido clorogénico esterificado a la pulpa de café, usando el diseño de mezclas.

El capítulo 12 presenta la optimización de las condiciones de cultivo (fuente de carbono y nitrógeno, micro-nutrientes, temperatura, tamaño de partícula) para obtener un extracto enzimático que presentara las actividades enzimáticas necesarias para extraer el ácido clorogénico esterificado en la pulpa de café y evitar la producción de la clorogenato esterasa, usando el diseño experimental tipo Plackett-Burman y el diseño factorial central compuesto. Por último, se comprueba la extracción del ácido clorogénico esterificado a pared celular de la pulpa de café con el extracto enzimático crudo producido por fermentación en medio sólido en las condiciones optimizadas.

## **9 DESARROLLO DE METODOLOGÍAS (ENZIMÁTICA Y DE RESPIROMETRÍA)**

En este capítulo se presentan los resultados y discusión al desarrollar los métodos cuantitativos para la evaluación de las actividades enzimáticas: pectinasa, xilanasas, celulasa y clorogenato esterasa. Además del sistema innovador de medición de la respirometría para FMS capaz de medir  $\text{CO}_2$  (%),  $\text{O}_2$  (%), flujo másico en diversos canales y ser operado remotamente.

### **9.1 ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD XILANASA, PECTINASA Y CELULASA EN CAJAS DE PETRI**

En esta sección se muestran los resultados de la técnica de cuantificación de la actividad pectinasa, xilanasas y celulasa en cajas de Petri. Las técnicas de selección de cepas deben ser rápidas, sencillas y permitir determinar la variable respuesta de manera cuantitativa. Los ensayos que permiten determinar la presencia de la actividad enzimática en cajas Petri de algún microorganismo o extracto son en su mayoría técnicas cualitativas (Tabla 9.1).

El objetivo de este ensayo fue demostrar que el ensayo en cajas de Petri con agar puede ser utilizado para determinar de manera cuantitativa la actividad de las enzimas hidrolíticas: pectinolíticas, xilanolíticas y celulolíticas a través de la medición de los halos de aclaramiento. También se busca desarrollar un método de ensayo preciso y práctico para realizar la selección de microorganismos productores de las enzimas de interés de una población de microorganismos.

**Tabla 9.1.** Ensayos en cajas de Petri reportados para determinar las actividades enzimáticas

Microorganismo	Tipo de ensayo	Técnica	Referencia
Bacterias	Cualitativo	Detección de la actividad fosfatasa, lipasa, proteasa por la presencia de halos de hidrólisis.	Jerome y col., 1976
Bacterias y hongos	Cualitativo	Detección de la actividad pectinasa por la presencia de halos de hidrólisis.	Antier y col., 1993
Bacterias y hongos	Cualitativo	Detección de la actividad xilanasa por la presencia de halos de hidrólisis.	Yang y col., 1995
Bacterias	Cualitativo	Detección de la actividad de liasas e hidrolasas por la presencia de halos de hidrólisis.	Ladjama y col., 2007
Hongos	Cuantitativo	Determinación de la actividad poligalacturonasa. El diámetro de los halos de hidrólisis fue proporcional al logaritmo de la concentración de la enzima.	Akinrefon y col., 1968
Bacteria	Cuantitativo	Determinación de la actividad proteasa. El diámetro de los halos de hidrólisis fue proporcional al logaritmo de la actividad enzimática.	Montville y col., 1983

En este ensayo se utilizaron cajas Petri con 2 g/L de pectina ó xilano ó CM-celulosa y 15 g/L de agar. Primeramente se determinó el volumen de gota que permitió tener linealidad en los ensayos. En la Tabla 9.2 se muestran el análisis estadístico de los halos de hidrólisis para los diferentes volúmenes de gota ensayados con los ensayos de pectinasa, xilanasa y celulasa (0.1 – 1.5 U/caja) incubadas a 35°C por 24 h.

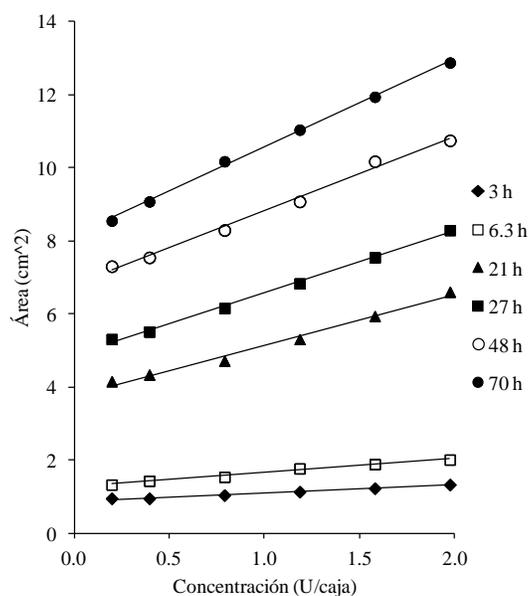
Se observa que para todos los tamaños de gota, la concentración con respecto al área de hidrólisis fue lineal sin embargo, para el tamaño de gota de 5 µl y 10 µl los halos de hidrólisis no fueron simétricos ni reproducibles. En estos ensayos las gotas presentaron deformaciones al ser depositadas en las placas de agar. Por lo que se decidió trabajar con un tamaño de gota de 3 µl.

**Tabla 9.2.** Análisis estadístico de los halos de hidrólisis con diferentes volúmenes de gota

Volumen (μL)	F	Nivel de significancia $\alpha$	Coefficiente de determinación $R^2$	Desviación estándar
<i>Pectinasa</i>				
3	363.3	<0.001	0.97	0.008
5	143.5	<0.001	0.96	0.020
10	253.7	<0.001	0.95	0.031
<i>Xilanasa</i>				
3	434.5	<0.001	0.98	0.003
5	289.6	<0.001	0.95	0.034
10	260.41	<0.001	0.95	0.056
<i>Celulasa</i>				
3	397.9	<0.001	0.97	0.005
5	272.9	<0.001	0.96	0.026
10	270.9	<0.001	0.95	0.042

Ensayos por triplicado

En la Figura 9.1 se muestran los ensayos con xilanasa comercial (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones de 0.2 a 2 U/caja. Se observa que la linealidad del ensayo con xilanasa comercial se mantiene a diferentes concentraciones de la enzima xilanasa por un periodo de 3 a 70 h. En la Tabla 9.3 se presenta el análisis estadístico de cada una de las curvas obtenidas.

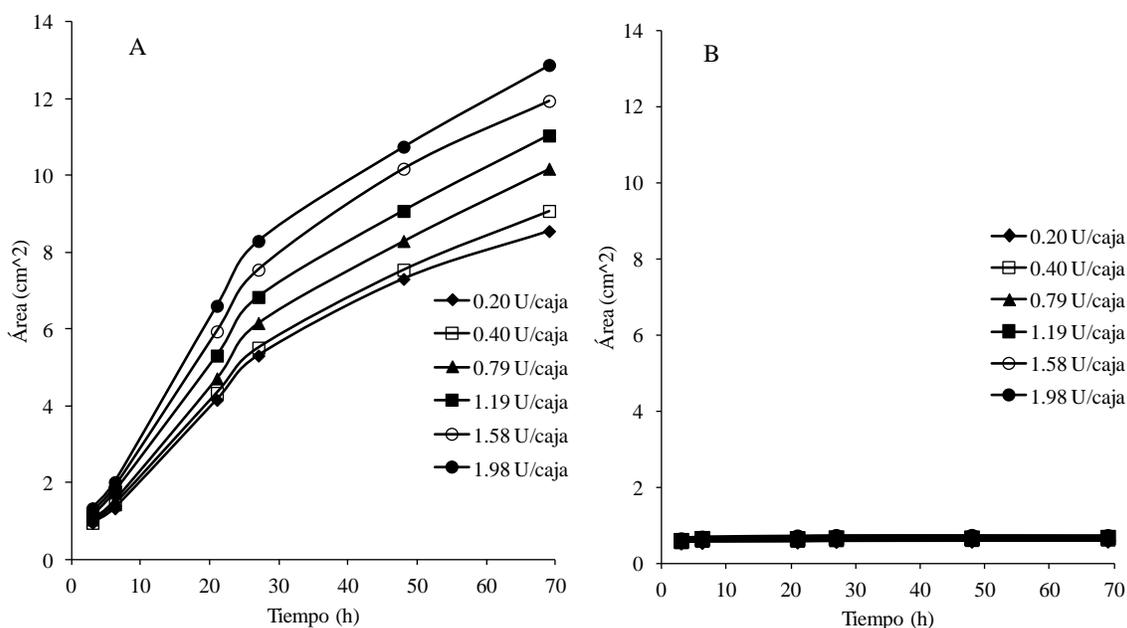
**Figura 9.1.** Ensayos con xilanasa comercial (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones y periodos de incubación

**Tabla 9.3.** Análisis de las curvas obtenidas en diferentes periodos de incubación

Periodo de incubación (h)	Pendiente (cm caja/U)	Ordenada a la origen (cm)	R <sup>2</sup>
3	0.22	0.88	0.9897
6.3	0.39	1.26	0.9869
21	1.38	3.76	0.9932
27	1.70	4.88	0.9999
48	2.03	6.79	0.9938
70	2.42	8.15	0.9955

En la Tabla 9.3 se observa una  $R^2 > 0.98$  para el ajuste del modelo lineal en cada una de las curvas obtenidas con diferentes concentraciones de la enzima xilanasas comercial. Esto permitió construir las curvas patrón de actividad enzimática para las enzimas pectinasa, xilanasas y celulasa.

En la Figura 9.2 se muestran los perfiles de actividad enzimática para diferentes concentraciones de la xilanasas comercial (0.2 a 2 U/caja, Sigma-Aldrich) por un periodo de incubación de 3 h a 70 h. Para cajas con xilano (A) y sin xilano (B).



**Figura 9.2.** Perfiles de actividad enzimática para diferentes concentraciones de xilanasas comercial (Sigma-Aldrich) por un periodo de 3 a 70 h. A: Cajas Petri con 2 g/L de xilano y 15 g/L de agar; B: Cajas Petri con 15 g/L de agar

En la Figura 9.2.A se observa en un mismo periodo de tiempo que conforme aumenta la concentración de enzima aumenta el área del halo de hidrólisis. En todas las concentraciones ensayadas se observa un incremento rápido del área del halo de hidrólisis hasta las 30 h. Después de las 30 h de ensayo la tasa de crecimiento del área del halo de hidrólisis disminuye. Esto se debe probablemente a que con el tiempo la actividad enzimática se va perdiendo. Las velocidades de incremento en el halo de hidrólisis no presentaron diferencias significativas, estuvieron alrededor de  $0.077 \pm 0.04$  cm/h para las diferentes concentraciones. En la Figura 9.2.B se observa que el halo de hidrólisis permaneció constante alrededor de los 0.6 cm. No se observa halo de hidrólisis por la ausencia de sustrato (xilano para la enzima).

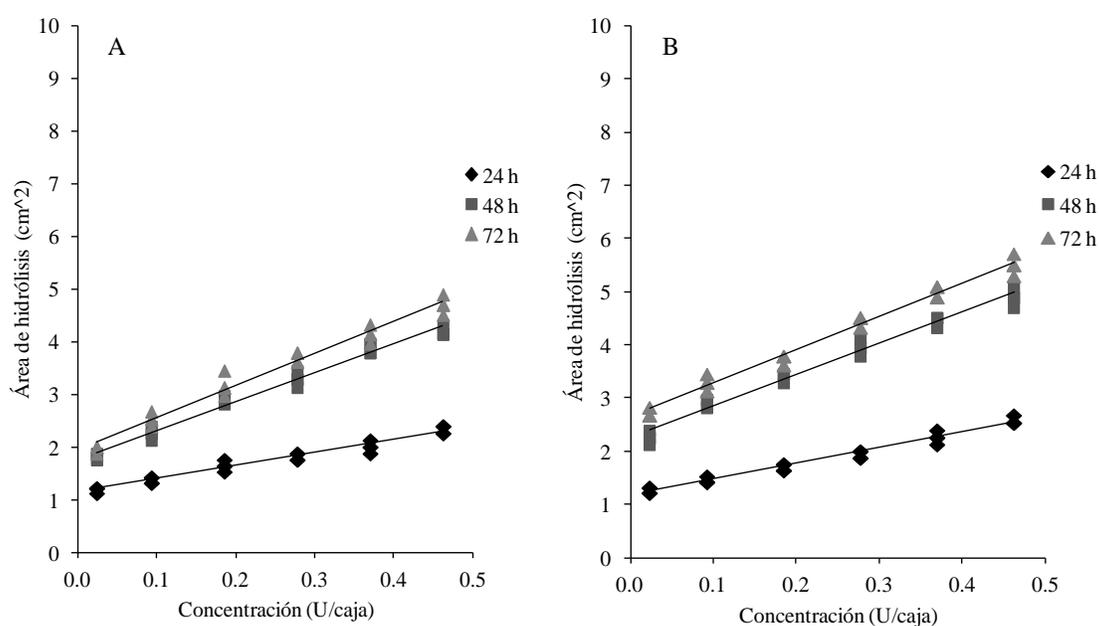
Los geles son considerados materiales semi-sólidos porosos. Están constituidos por macromoléculas en solución acuosa diluida. Los espacios de un gel están llenos de agua. Las velocidades de difusión en sólidos es menor que la difusión en soluciones acuosas. Los geles típicos son el gel de agarosa, el agar y la gelatina. La difusión es un proceso irreversible en el cual las moléculas que se encuentran en un punto se transfieren o desplazan a través de un medio donde las moléculas en un inicio estaban ausentes, aumentando la entropía del sistema (Geankoplis, 1999).

La difusividad en el agar de un soluto disminuye de manera lineal al aumentar la concentración del agar en el medio. Por otra parte la difusividad en el agar también se ve afectada por la concentración del soluto (Geankoplis, 1999). Como se observa en la Figura 8.2 el aumento del halo de hidrólisis o aclaramiento puede deberse: a) El aumento de la concentración de enzima incrementa la hidrólisis del xilano y por ende aumenta el halo de hidrólisis y b) Al aumentar la concentración de enzima se promueve el fenómeno de difusión de las enzimas hacia el medio pues la fuerza motriz de la difusión aumenta ( $\Delta C$ ) se incrementa. Sin embargo, también hay que tomar en cuenta que la difusión de macromoléculas como las enzimas en agares se ve afectada por el tamaño, forma y vida media de la enzima. En las interacciones de las macromoléculas con los solutos del medio afectan también la difusión (Geankoplis, 1999).

Para determinar las condiciones para llevar a cabo la medición de la actividad enzimática de la pectinasa, xilanasa y celulasa, se realizaron ensayos para obtener las curvas patrón a las 24 h, 48 h y 72 h incubadas a 30°C y 40°C.

### 9.1.1 Actividad pectinasa en cajas de Petri

En la Figura 9.3 se presentan las curvas patrón a una temperatura de incubación de 30°C y 40°C por diferentes periodos de tiempo para la enzima comercial pectinasa (Sigma-Aldrich).



**Figura 9.3.** Actividad pectinasa en cajas Petri con 2 g/L de pectina a las 24 h, 48 h y 72 h. A: 30°C; B: 40°C

En la Figura 9.3.A se presentan las curvas estándar a diferentes concentraciones de la pectinasa comercial. El incremento de la pendiente fue más pronunciado de las 24 h a las 48 h. De las 48 h a las 72 h la pendiente permaneció casi constante. Este comportamiento se observa de igual manera en la Figura 9.3.B. En la Tabla 9.4 se observa para las temperaturas de 30°C y 40°C que de las 24 h a las 48 h el incremento de la pendiente fue de 2.2 y 2 veces, respectivamente. Mientras que de las 48 h a las 72 h el incremento de la pendiente fue de un 10% al incrementar la temperatura de 30°C a 40°C. Esto puede deberse a la pérdida de la actividad enzimática de las 48 h a las 72 h de la enzima comercial.

En la Tabla 9.4 se muestra el análisis estadístico de los ensayos a diferentes concentraciones de la pectinasa comercial (Sigma-Aldrich).

**Tabla 9.4.** Análisis estadístico de la regresión lineal para la actividad de la pectinasa comercial

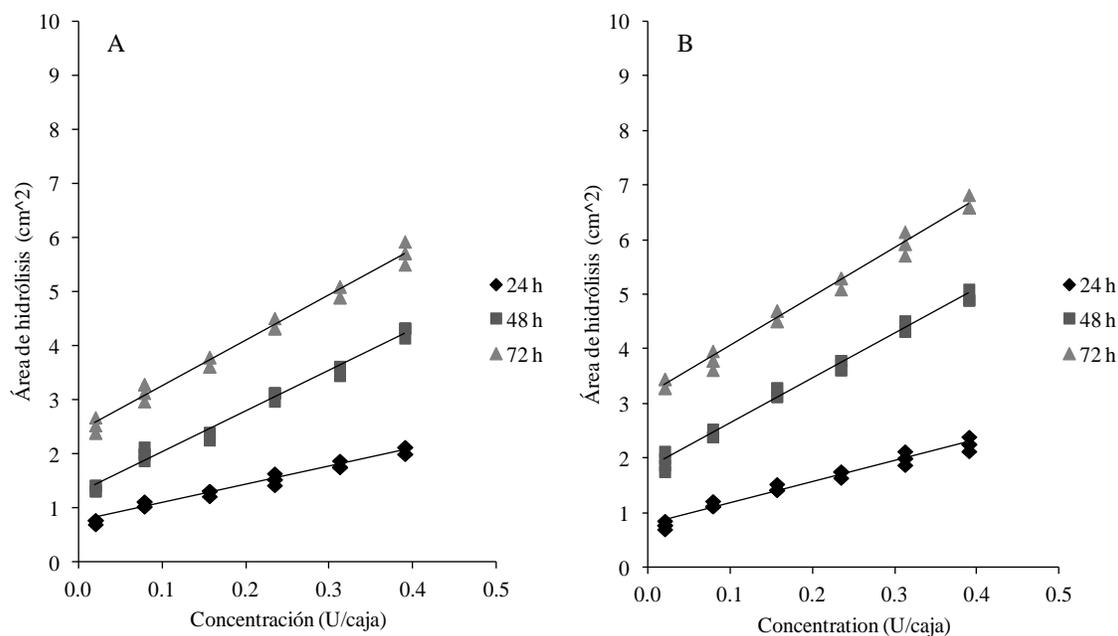
Temperatura	Tiempo	Modelo lineal	R <sup>2</sup>	F
30°C	24h	$A = 2.48C + 1.15$	0.961	558.3
	48h	$A = 5.49C + 1.77$	0.981	1217.6
	72h	$A = 6.09C + 1.95$	0.976	940.9
40°C	24h	$A = 2.95C + 1.18$	0.975	902.4
	48h	$A = 5.89C + 2.28$	0.978	1007.9
	72h	$A = 6.28C + 2.66$	0.985	1512.1

$\alpha < 0.001$ ; A: Área de hidrólisis (cm<sup>2</sup>); C: concentración (U/caja)

La pendiente de las curvas en el mismo periodo de tiempo pero incubadas a diferentes temperaturas también presentaron un incremento. A las 24 h, 48 h y 72 h se observa un incremento del 20%, 10% y 3%, respectivamente al pasar de una temperatura de 30°C a 40°C. Todas las curvas estándar presentaron regresión lineal con un  $R^2 > 0.97$  ( $\alpha < 0.001$ ).

### 9.1.2 Actividad xilanasa en cajas de Petri

En la Figura 9.4 y Tabla 9.5 se muestran los resultados de las curvas estándar a diferentes concentraciones, temperaturas y periodos de incubación para la xilanasa comercial (Sigma-Aldrich).



**Figura 9.4.** Actividad xilanasa en cajas Petri con 2 g/L de xilano a las 24, 48 y 72 h. A: 30°C; B: 40°C

**Tabla 9.5.** Análisis estadístico de la regresión lineal para la actividad de la xilanasa comercial

Temperatura	Tiempo	Modelo lineal	R <sup>2</sup>	F
30°C	24h	$A = 3.38C + 0.76$	0.977	962.5
	48h	$A = 7.55C + 1.29$	0.986	1612.9
	72h	$A = 8.43C + 2.42$	0.986	1618.8
40°C	24h	$A = 3.88C + 0.80$	0.971	773.4
	48h	$A = 8.16C + 1.83$	0.988	1939.7
	72h	$A = 8.92C + 3.18$	0.989	2155.8

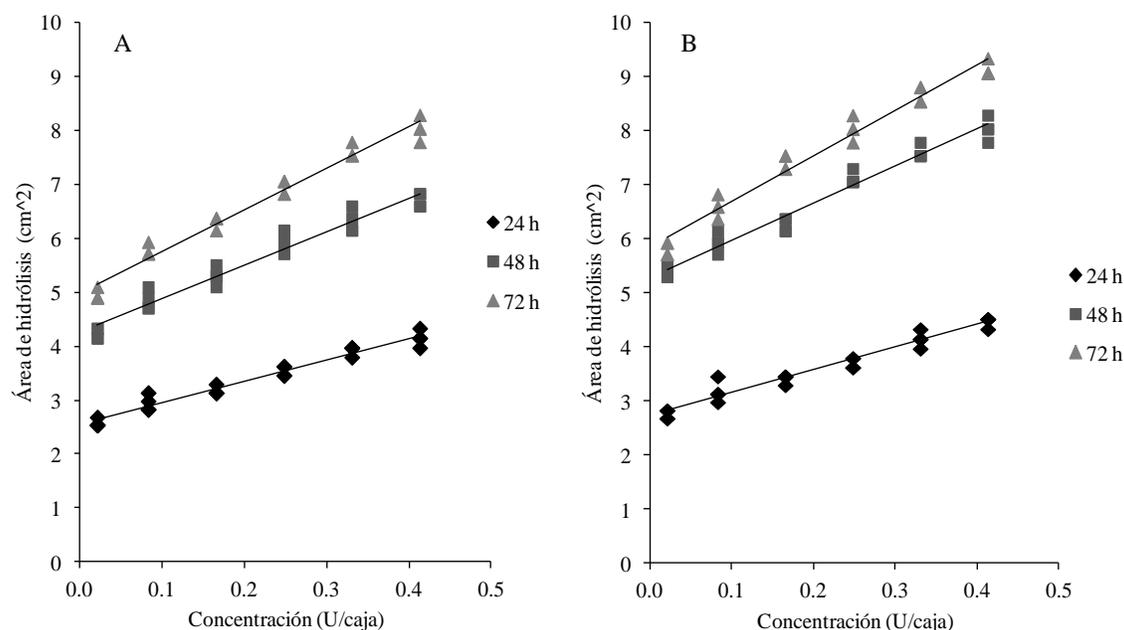
$\alpha < 0.001$ ; A: Área de hidrólisis (cm<sup>2</sup>); C: concentración (U/caja)

Las curvas estándar de la xilanasa comercial (Figura 9.4) presentaron incrementos en la pendiente al pasar de las 24 h, 48 h y 72 h. El incremento en la pendiente fue más pronunciado de las 24 h a las 72 h y se observaron cambios significativos entre las diferentes temperaturas de incubación.

En la Tabla 9.5 se observa que conforme transcurre el tiempo de incubación el área del halo de hidrólisis aumenta. En las temperaturas de incubación de 30°C y 40°C de las 24 h a las 48 h el incremento en la pendiente fue de 2.2 y 2.1, respectivamente. El aumento en el área de hidrólisis también se vió afectado por la temperatura; a las 24 h, 48 h y 72 h la pendiente incrementó 20%, 10% y 10%, respectivamente al pasar de una temperatura de incubación de 30°C a 40°C. Todas las curvas estándar presentaron regresión lineal con un  $R^2 > 0.97$  ( $\alpha < 0.001$ ).

### 9.1.3 Actividad celulasa en cajas de Petri

En la Figura 9.5 y Tabla 9.6 se muestran los resultados de las curvas estándar a diferentes concentraciones, temperaturas y periodos de incubación para la celulasa comercial (Sigma-Aldrich).



**Figura 9.5.** Actividad celulasa en cajas Petri con 2 g/L de CM-celulosa a las 24, 48 y 72 h. A: 30°C; B: 40°C

En la Figura 9.5 se observa que en todos los tiempos de incubación se presentó linealidad. La pendiente de las 24 h a las 48 h presentó un incremento. De las 48 h a las 72 h el incremento fue menos pronunciado.

En la Tabla 9.6 se muestra el análisis estadístico de las curvas estándar de la celulasa comercial.

**Tabla 9.6.** Análisis estadístico de la regresión lineal para la actividad de la celulasa comercial

Temperatura	Tiempo	Modelo lineal	R <sup>2</sup>	F
30°C	24h	$A = 4.01C + 2.55$	0.962	577.7
	48h	$A = 6.19C + 4.26$	0.957	514.4
	72h	$A = 7.69C + 4.99$	0.974	853.1
40°C	24h	$A = 4.22C + 2.73$	0.955	487.4
	48h	$A = 6.82C + 5.30$	0.970	715.2
	72h	$A = 8.36C + 5.87$	0.969	727.2

$\alpha < 0.001$ ; A: Área de hidrólisis (cm<sup>2</sup>); C: concentración (U/caja)

En la Tabla 9.6 se observa que las pendientes de las curvas estándar aumentan conforme aumentó el tiempo de incubación. El incremento de la pendiente de las 24 h a las 48 h a los 30°C y 40° fue alrededor del 40%. De las 48 h a las 72 h el incremento de la pendiente a los 30°C y 40°C fue de 1.2 veces para ambas temperaturas de incubación. Por otro lado, se observa que al pasar de una temperatura de incubación de 30°C a 40°C las pendientes aumentan. Al pasar de una temperatura de incubación de 30°C a 40°C los incrementos en la pendiente a las 24 h, 48 h y 72 h fue del 10% para todos los periodos de incubación. Todas las curvas estándar presentaron regresión lineal con un  $R^2 > 0.96$  ( $\alpha < 0.001$ ).

Los resultados aquí mostrados se pueden explicar por el efecto de la temperatura sobre la difusividad. Por ejemplo la difusividad de la ureasa a través de un gel se ve afectada por la temperatura ya que a 25°C la difusividad fue de  $4.01 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s, mientras que a 20°C la difusividad fue de  $3.46 \times 10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s (Geankoplis, 1999). Esto se debe a que tanto la actividad enzimática de la ureasa aumenta por la temperatura como que la difusividad de los solutos en el gel se ve afectada por la temperatura.

En cada uno de los ensayos con las diferentes enzimas comerciales (Figuras 9.3, 9.3, 9.5) se observó que en el mismo periodo de tiempo al aumentar la temperatura de incubación de 30°C a 40°C el área de hidrólisis también aumenta, esto puede deberse: a) La temperatura afecta positivamente la actividad enzimática de las enzimas promoviendo que se hidrolice más sustrato y b) La difusividad de los solutos y enzimas en el agar aumenta por el aumento en la temperatura.

Es así que este ensayo presenta una suma de fenómenos donde están implicadas la concentración de las enzimas, tamaño de la enzima, la concentración del sustrato, tamaño del sustrato, la concentración el agar y la temperatura, por lo que en un futuro será interesante estudiar cómo afectan todos estos fenómenos a este ensayo de reacción y difusión simultánea.

#### **9.1.4 Conclusiones sobre la cuantificación de la actividad enzimática en cajas de Petri**

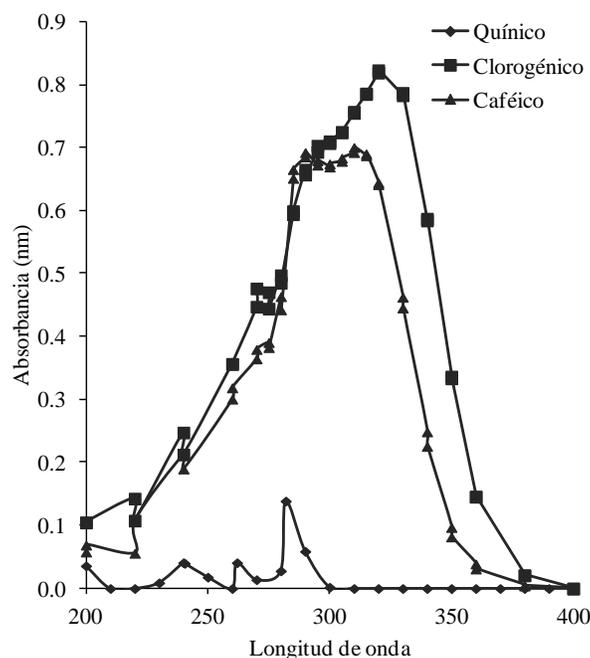
El ensayo realizado resultó ser simple que puede ser utilizada para cuantificar la actividad enzimática pectinasa, xilanasas y celulasa de los microorganismos.

El ensayo permitió determinar de manera cualitativa la presencia de las actividades enzimáticas por la presencia del halo de hidrólisis y determinar de manera cuantitativa las actividades enzimáticas mediante las curvas estándar.

Las áreas determinadas a partir de medir el diámetro del halo de aclaramiento debido a la hidrólisis en los cuatro puntos cardinales es linealmente proporcional a la concentración de enzima (U/caja).

## 9.2 ADAPTACIÓN DE UNA TÉCNICA PARA DETERMINAR DE FORMA INDIRECTA LA ACTIVIDAD CLOROGENATO ESTERASA A PARTIR DE MEDIR LA HIDRÓLISIS DEL ACIDO CLOROGÉNICO

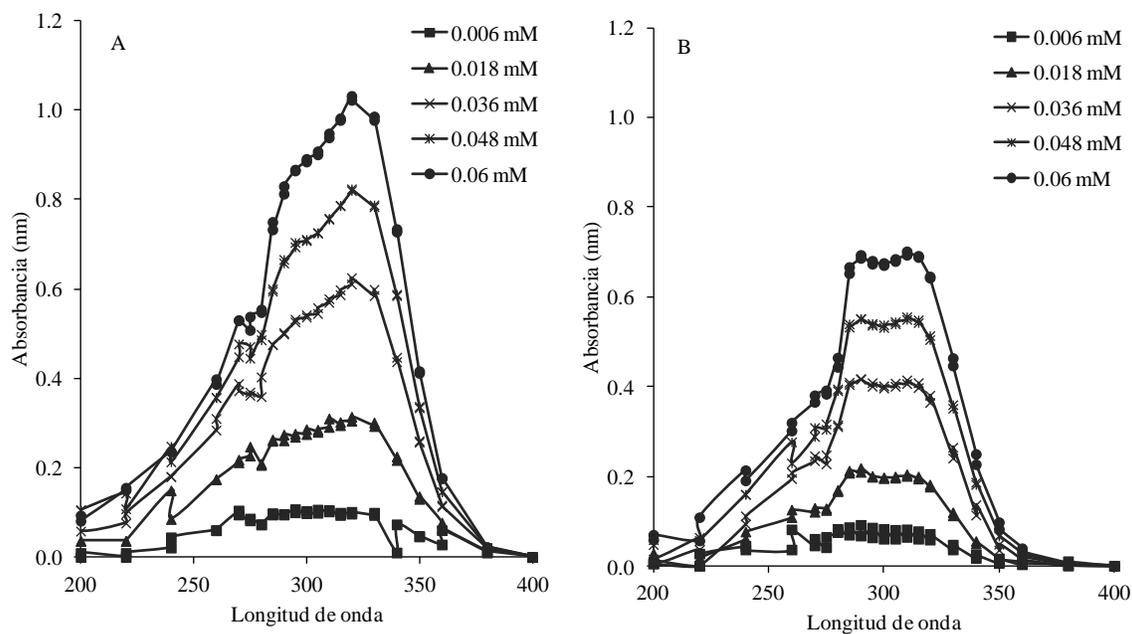
Se adaptó una técnica para medir indirectamente la actividad clorogenato esterasa (ACIE) por espectrofotometría se determinó a partir de medir el consumo de ACI y aparición de AC. Primeramente se determinaron los espectros de absorción del ACI, AC y AQ disueltos en 50% metanol:agua (Figura 9.6).



**Figura 9.6.** Espectros de absorción del ACI, AC y AQ

En la Figura 9.6 se observa que el ACI presentó un pico de absorción característico a 320 nm. El AC presentó dos picos de absorción a 290 y 310 nm. El AQ presentó dos picos de absorción a 262 y 282 nm. El ACI es el compuesto más importante de determinar durante la ACIE, para poder determinar su hidrólisis fue necesario medir la absorbancia a 290 y 320 nm ambas longitudes de ondas presentaron en su absorbancia la presencia del ACI y el ACI hidrolizado a AC en el medio de reacción. A las dos longitudes de ondas ensayadas la presencia del AQ no tuvo un efecto significativo sobre la absorbancia medida. Por otro lado, fue importante determinar cuál era la concentración mínima detectable a la cual se podría tener el mínimo error experimental para identificar el ACI y AC. En la

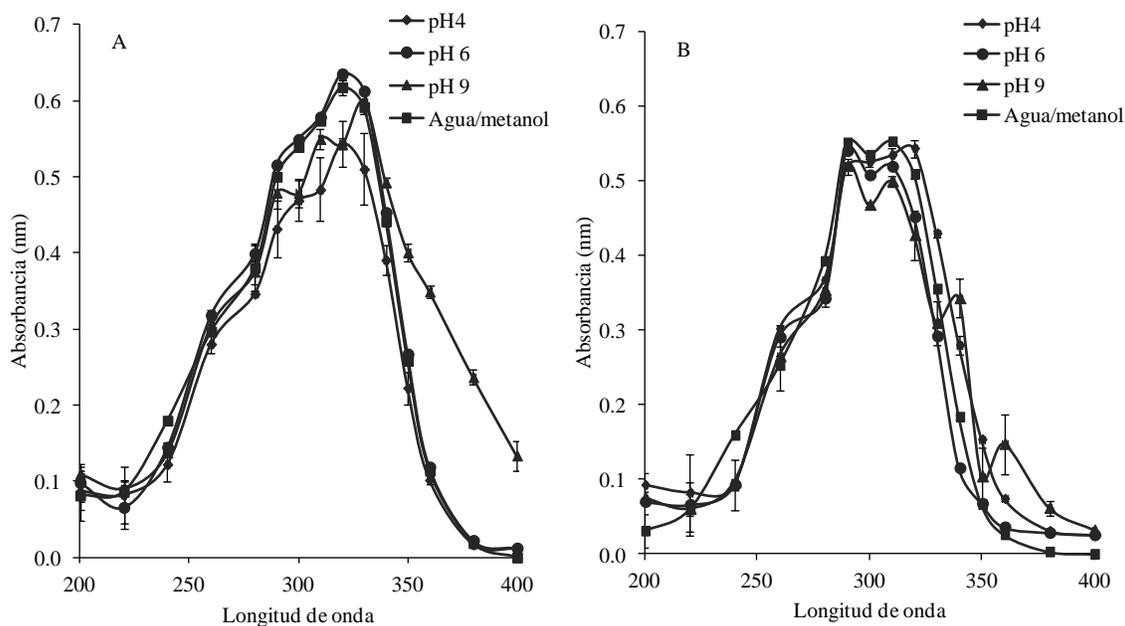
Figura 9.7 se presentan los espectros de absorción del ACI y AC a diferentes concentraciones.



**Figura 9.7.** Espectros de absorción a diferentes concentraciones. A: ACI; B: AC

En la Figura 9.7 se observa que a 0.018 mM fue la concentración mínima a la cual se pudo identificar el ACI y AC. El espectro de absorción del ACI y AC es una forma sencilla de identificar estos compuestos ya que sus perfiles permanecen a diferentes concentraciones.

La hidrólisis del ACI por acción de la CIE da lugar a la formación de AC y AQ, ambas moléculas modifican el pH durante la reacción por lo que se determinó el efecto del pH sobre los espectros de absorción del ACI y AC (Figura 9.8). Los ensayos fueron realizados por duplicado a una concentración de 0.04 mM.



**Figura 9.8.** Espectros de absorción a diferentes pH. A: ACI; B: AC

En la Figura 9.8.A se observan perfiles similares y característicos para los espectros y picos de absorción del ACI a pH 4 y 6. Sin embargo, el espectro de absorción a pH 9 fue diferente a los anteriores. Esto dificulta la determinación del ACI a pH 9. Lo anterior tiene que ver a que el pKa del ACI es de 4.2.

En la Figura 9.8.B se observa que a pH 4 el espectro de absorción y picos de absorción característicos del AC se desplazaron cerca de 10 unidades con respecto a los espectros de absorción y picos de absorción presentes a pH 6 y 9. El pKa reportado del AC es de 3.15.

La ACIE se midió a partir de la hidrólisis del ACI por acción del extracto enzimático crudo producido por FMS por cada uno de los hongos filamentosos utilizados en este estudio. La reacción enzimática se llevó a cabo a un pH de 5 a 40°C por 20 min. La hidrólisis del ACI se midió a 290 y 320 nm. La ACIE se determinó por la presencia de AC e hidrólisis del ACI a partir de la ecuación de la Ley de Beer (Ralet y col., 1994).

En la sección 7.7.2 de M & M se mostró que para determinar la concentración de ACI ( $C_1$ ) y AC ( $C_2$ ) a partir de las ecuaciones (3) y (4) era necesario calcular los coeficientes de extinción molar del ACI y AC a 290 y 320 nm.

$$C_1 = \frac{\epsilon_{2\lambda 2} A_{\lambda 1} - \epsilon_{2\lambda 1} A_{\lambda 2}}{\epsilon_{1\lambda 1} \epsilon_{2\lambda 2} - \epsilon_{2\lambda 1} \epsilon_{1\lambda 2}} \quad (3) \quad C_2 = \frac{\epsilon_{1\lambda 1} A_{\lambda 2} - \epsilon_{1\lambda 2} A_{\lambda 1}}{\epsilon_{1\lambda 1} \epsilon_{2\lambda 2} - \epsilon_{2\lambda 1} \epsilon_{1\lambda 2}} \quad (4)$$

Se midió la absorbancia a 290 y 320 nm de soluciones estándar de ACl y AC en un rango de 0 - 2 mM por triplicado a pH 5. Se graficó la concentración (mM) vs absorbancia (nm), donde la pendiente de la recta representó el coeficiente de extinción molar (Tabla 9.7).

**Tabla 9.7.** Coeficientes de extinción molar y análisis estadístico

Compuesto		Coeficientes de extinción molar ( $\lambda$ /mM)		R <sup>2</sup>	F
ACI	320 nm	$\epsilon_{1\lambda 1}$	$1.725 \pm 0.025$	0.998	4725.09
	290 nm	$\epsilon_{1\lambda 2}$	$1.169 \pm 0.046$	0.983	646.81
AC	320 nm	$\epsilon_{2\lambda 1}$	$0.671 \pm 0.002$	0.999	55299.16
	290 nm	$\epsilon_{2\lambda 2}$	$1.121 \pm 0.044$	0.983	631.71

$\alpha < 0.001$

La técnica se validó a partir de preparar mezclas de ACl con AC en concentraciones conocidas (0 – 2 mM) a partir de la Ecs. (3) y (4) se determinó la concentración de ACl sin hidrolizar y AC producto de la hidrólisis del ACl en el medio de reacción (Tabla 9.8). Además se determinó que el cambio de absorbancia en función de la concentración de AC y ACl es lineal de 0 a 3.5 unidades de absorbancia.

En la Tabla 9.8 se observa que la concentración conocida de una mezcla de ACl y AC fue similar a la concentración determinada a partir de las ecuaciones (3) y (4). El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.999 entre cada una de las concentraciones de ACl y AC determinadas por las Ecs. (3) y (4) y cada una de las concentraciones de la solución estándar de ACl y AC. Esto nos indica que el método empleado determinó de manera correcta las concentraciones de ACl y AC en el medio de reacción. El coeficiente de correlación de Pearson mide el grado de covariación entre las distintas variables relacionadas linealmente. Los valores absolutos del coeficiente de correlación de Pearson oscilan entre 0 y 1, entre más cercano sea el valor a 1, mayor será la correlación entre los datos de las matrices (Box y col., 2008).

**Tabla 9.8.** Validación de la técnica para medir la actividad CIE

Ensayo	Absorbancia (nm)		Ácido clorogénico (mM)		Ácido cafeico (mM)	
	290	320	Soln.	Estimado por	Soln.	Estimado por
			Problema	Ec. (2)	Problema	Ec. (3)
1	2.189	1.331	0.00	0.02	2.00	1.93
1	2.188	1.324	0.00	0.01	2.00	1.94
2	2.283	1.597	0.20	0.22	1.80	1.80
2	2.291	1.598	0.20	0.22	1.80	1.81
3	2.273	1.969	0.60	0.59	1.40	1.41
3	2.275	1.989	0.60	0.61	1.40	1.40
4	2.280	2.392	1.00	1.00	1.00	0.99
4	2.280	2.398	1.00	1.01	1.00	0.98
5	2.291	2.799	1.40	1.39	0.60	0.59
5	2.301	2.799	1.40	1.39	0.60	0.61
6	2.345	3.436	2.00	1.98	0.00	0.02
6	2.345	3.460	2.00	2.01	0.00	0.00

Como muestran los resultados el método de espectrofotometría antes descrito, puede ser utilizado para medir la ACIE de manera indirecta a partir de la presencia de ACI y la hidrólisis del ACI a AC. Esta técnica se utilizó para determinar la presencia de la ACIE en los extractos enzimáticos producidos por FMS.

### 9.2.1 Conclusiones de la técnica para determinar de forma indirecta la actividad clorogenato esterasa

El ACI y AC pueden ser identificados a través de sus espectros de absorción característicos, los cuales no se modifican ni con la concentración y ni con el pH.

La técnica para medir la ACIE por espectrofotometría resultó ser sencilla, precisa y reproducible para medir las concentraciones de ACI sustrato de la reacción y la AC producido por la hidrólisis del ACI.

### 9.3 EVALUACIÓN DEL MONITOREO EN LÍNEA DE CO<sub>2</sub> Y O<sub>2</sub> (RESPIROMETRÍA)

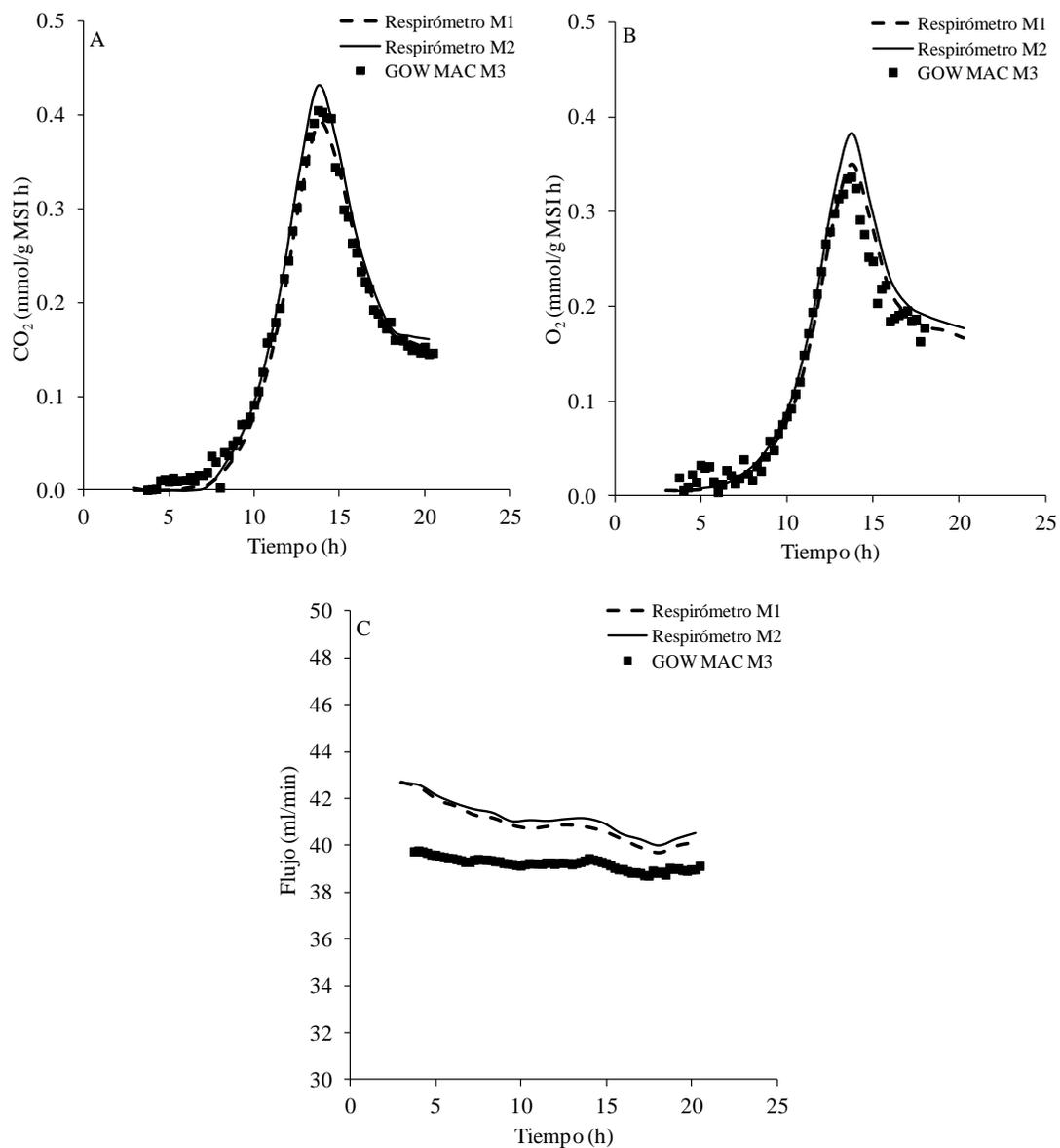
En esta sección se muestran los resultados al desarrollar un sistema innovador de medición de la respirometría para FMS capaz de medir CO<sub>2</sub> (%), O<sub>2</sub> (%), flujo másico en diversos canales y ser operado remotamente. Se compararon dos sistemas de monitoreo en línea de las concentraciones de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>: 1) El sistema de respirómetro desarrollado y 2) el sistema por cromatografía de gases GOW-MAC. Se presenta un análisis comparativo al utilizar el modelo de Gompertz y Logístico para describir los perfiles de CO<sub>2</sub> producido durante la FMS utilizando residuos agro-industriales.

#### 9.3.1 Evaluación del monitoreo en línea por dos sistemas de respirometría

A continuación se muestran los resultados de la evaluación del monitoreo en línea del sistema de respirómetro y el cromatógrafo de gases GOW-MAC (Saucedo y col., 1994). Se realizó una FMS utilizando como soporte 1/3 de PC, 1/3 de GO y 1/3 de BC. Se impregnó el soporte con el medio de cultivo y se inoculó con  $1 \times 10^8$  esporas/g de SS producidas por *R. pusillus*. Se probaron 2 medios de cultivo. El primer medio presentó una concentración (g/100 g de SS) de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.9; el segundo medio presentó una concentración de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5. La composición de ambos medios fue (g/100 g de SS): maltosa, 3.5; sacarosa, 5; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.1; solución de oligoelementos, 0.55 ml. El material fue empacado en columnas de 2 cm de diámetro por 15 cm de alto. El tamaño de partícula que se utilizó fue de 0.8 mm, la temperatura de incubación fue de 35°C y el flujo fue de 2 VKgM. El monitoreo en línea se registró durante 21 h.

Se prepararon 3 columnas por cada uno de los medios de cultivo, las columnas M1 y M2 fueron analizadas con el sistema de respirómetro desarrollado en este trabajo, la columna M3 fue analizada con un cromatógrafo de gases GOW-MAC (Saucedo y col., 1994). Este dispositivo usa He como gas acarreador a un flujo de 40 ml/min. Se ajustaron los parámetros de operación como sigue: Temperatura del detector, 80°C; temperatura del inyector, 80°C; temperatura de la columna, 50°C; corriente del detector 150 mA.

En la Figura 9.9 se presenta el  $\text{CO}_2$  producido, el consumo de  $\text{O}_2$  y flujo medido durante la FMS al usar el medio de cultivo 1. A partir de las concentraciones (%) de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ , el flujo medido y la cantidad de materia seca inicial (MSI) de cada columna, se determinó la cantidad de  $\text{CO}_2$  producido y  $\text{O}_2$  consumido en  $\text{mmol/g MSI h}$ , a fin de hacer una adecuada comparación de los resultados obtenidos en el sistema de respirometría desarrollado y en el sistema de cromatografía de gases (GOW-MAC).



**Figura 9.9.**  $\text{CO}_2$  producido (A),  $\text{O}_2$  consumido (B) y flujo medido (C) durante la FMS usando el medio de cultivo 1

En la Figura 9.9.A se observan perfiles muy similares de concentración de CO<sub>2</sub> producido para las mediciones realizadas con el sistema de respirometría desarrollado y el GOW-MAC. Los coeficientes de correlación fueron: M1 vs M3, 0.998; M2 vs M3 0.999.

En la Figura 9.9.B se observa que las mediciones realizadas por el sistema de respirometría desarrollado y el GOW-MAC presentan perfiles similares. Los coeficientes de correlación fueron M1 vs M3, 0.938; M2 vs M3 0.937.

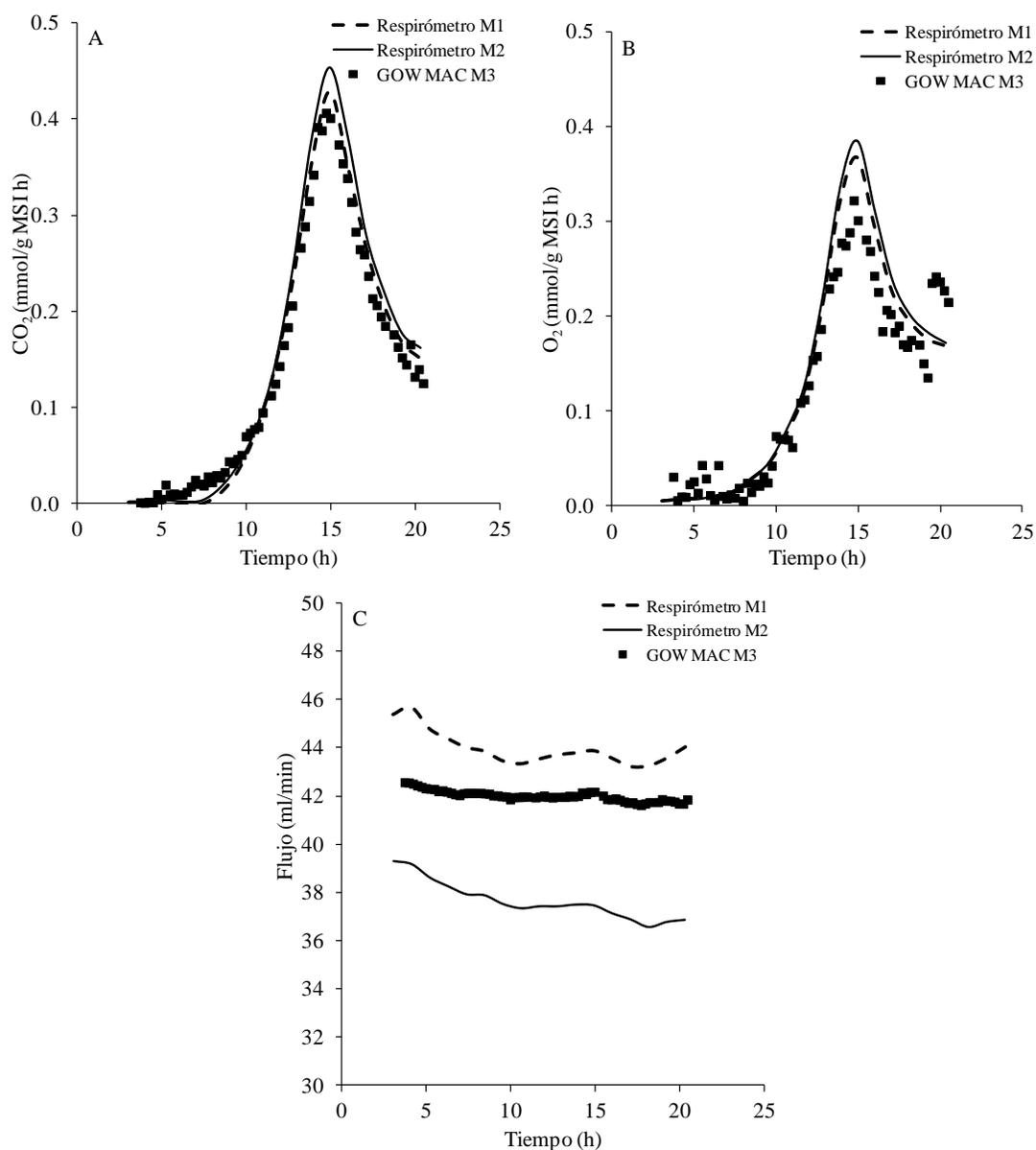
En la Figura 9.9.C se presentan las mediciones de flujo para cada uno de los ensayos. Se observa que los flujos estuvieron alrededor de los 40 ml/min. El porcentaje de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> que mide cualquier detector dependen del flujo de entrada de la corriente gaseosa, por lo que no medir el flujo puede incurrir en conclusiones erróneas sobre la eficiencia de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> en una FMS.

En la Figura 9.10 se presenta el CO<sub>2</sub> producido, el O<sub>2</sub> consumido y el flujo medido durante la FMS en la que se emplea el medio de cultivo 2.

En la Figura 9.10.A se observa que tanto las mediciones realizadas con el equipo de respirometría desarrollado como con el GOW-MAC presentan perfiles similares, los coeficientes de correlación fueron: M1 vs M3, 0.975; M2 vs M3 0.995.

En la Figura 9.10.B se observa de igual manera que las mediciones realizadas por el sistema de respirometría desarrollado y el GOW-MAC presenta perfiles similares con una variación de las 13 h a las 17 h de un 5%. Los coeficientes de correlación fueron M1 vs M3, 0.857; M2 vs M3 0.865.

En la Figura 9.10.C se presentan las mediciones de flujo para cada uno de los ensayos. Se observa que cada ensayo tuvo un flujo diferente y que fueron descendiendo a lo largo del ensayo. El ensayo M2 presentó los flujos más bajo, de aproximadamente 37 ml/min. El porcentaje de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> que mide cualquier detector dependen del flujo de entrada de la corriente gaseosa, por lo que sin mediciones del flujo puede incurrir en conclusiones erróneas sobre la producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> en una FMS.



**Figura 9.10.** CO<sub>2</sub> producido (A), O<sub>2</sub> consumido (B) y flujo medido (C) durante la FMS usando el medio de cultivo 2

En las Figuras 9.9 y 9.10 se observa que hay una diferencia alrededor del 3% entre el CO<sub>2</sub> producido y el O<sub>2</sub> consumido, sin embargo, la diferencia es aceptable. La máxima concentración de CO<sub>2</sub> producido coincide con la máxima concentración de O<sub>2</sub> consumido, lo cual era esperado.

El sistema de respirómetro desarrollado determina de manera adecuada la evolución del cultivo en medio sólido proporcionando datos de buena calidad que puede ser útil para realizar balances de materia y energía así como controles necesarios del proceso.

### 9.3.2 Comparación del modelo de Gompertz y el modelo Logístico

El CO<sub>2</sub> puede ser medido experimentalmente y su comportamiento puede ser modelado a través de modelos matemáticos conocidos, como el modelo Logístico o el modelo de Gompertz, dependiendo de las características de la fermentación y del ajuste entre los datos experimentales y los obtenidos por tales modelos (Figuroa-Montero, 2011).

#### *Modelo Logístico*

El modelo Logístico es ampliamente usado. La curva logística integrada es sigmoideal y simétrica con respecto al punto central de la inflexión (Berger, 1980)

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

#### *Modelo de Gompertz*

El modelo de Gompertz fue descrito en la ciencia actuaria para ajustar datos de mortalidad humana. Es ampliamente usado para describir el crecimiento microbiano en alimentos bajo condiciones controladas. La curva integrada es sigmoideal pero no simétrica con respecto al punto central de la inflexión (Berger, 1980).

$$\frac{dCO_2}{dt} = r_{CO_2} = \mu_{CO_2} CO_2 \ln \left( \frac{CO_{2max}}{CO_2} \right)$$

El perfil de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> se ajustó a partir de usar la forma diferencial tanto del modelo Logístico y como del el modelo de Gompertz. La resolución y estimación de cada uno de los parámetros de los modelos se realizó con ayuda de la rutina del programa Solver de Excel 2007. La  $\mu_{CO_2}$  es la actividad respiratoria del cultivo.

La función objetivo se definió como la minimización de la suma del cuadrado del error ( $SC$ ):

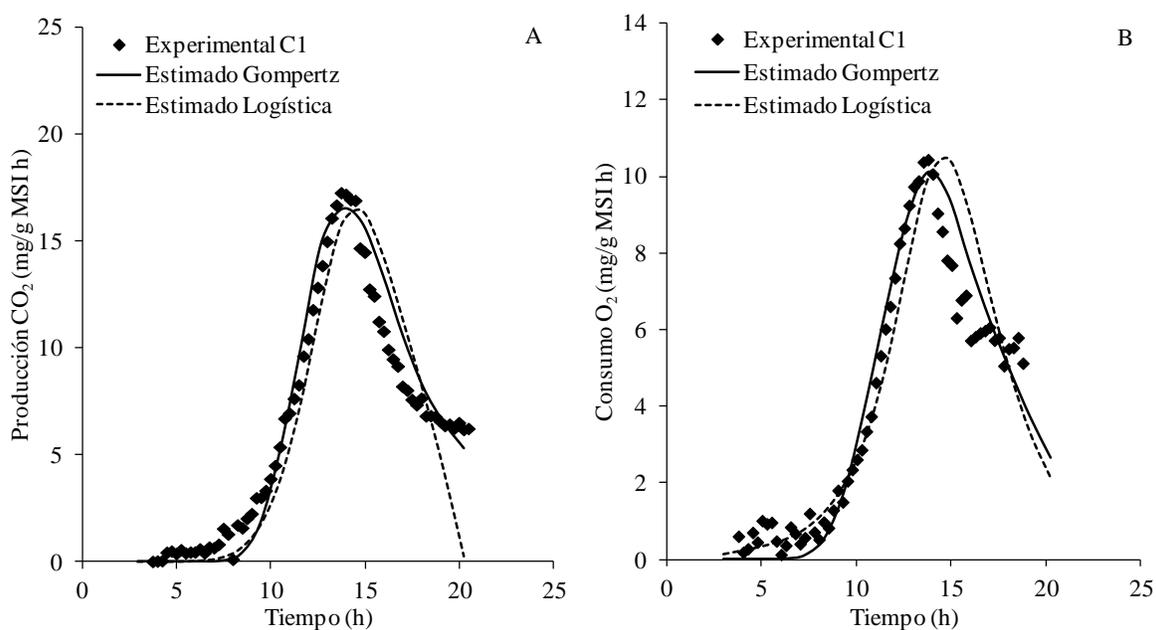
$$SC = \text{minimizar} \sum (y_i - r_{CO_2j})^2$$

Donde:

$y_j$ : Medición experimental de la tasa de producción de  $CO_2$  (mg/g MSI h)

$r_{CO_2j}$ : Tasa de producción de  $CO_2$  estimada por los modelos Logístico o Gompertz (mg/g MSI h)

En las Figuras 9.11 y 9.12 se presenta el ajuste de los modelos Logístico y Gompertz para los datos experimentales de los medios de cultivo C1 y C2 ensayados como se indicó en la sección anterior cuyo monitoreo en línea se realizó empleando el sistema de respirómetro desarrollado en este trabajo.

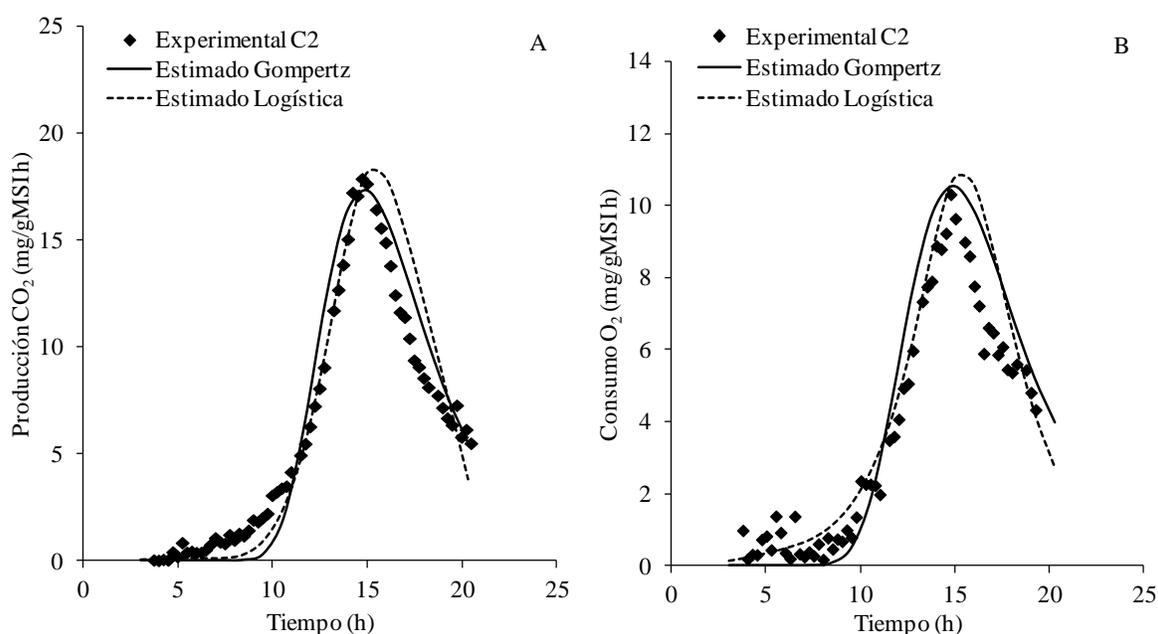


**Figura 9.11.** Perfil de producción de  $CO_2$  (A) y consumo de  $O_2$  (B) para C1, ajustados con el modelo Logístico y el modelo de Gompertz.

En la Figura 9.11 se observa que el modelo de Gompertz ajusta mejor el perfil de producción de  $CO_2$  y de  $O_2$  de los datos experimentales que el modelo Logístico. A las 15 h de cultivo cuando se alcanza la máxima tasa de producción de  $CO_2$  (TPC) y la mayor tasa

de consumo de  $O_2$  (TCO) se observa que el modelo de Gompertz predice el tiempo y el valor de la máxima TPC y TCO. La máxima TPC experimental fue 10 % mayor que la máxima TPC calculada para el modelo de Gompertz y Logístico. El modelo Logístico predice que la máxima TPC y TPO se da una hora después de que se alcanza la máxima TPC y TCO experimental. La máxima TCO experimental no presentó diferencias significativas con la máxima TCO calculada por el modelo de Gompertz y Logístico.

En la Figura 9.12 se presentan los perfiles de producción de  $CO_2$  y consumo de  $O_2$  para el medio de cultivo C2 ensayado. Además se muestra el ajuste del modelo Logístico y el modelo de Gompertz.



**Figura 9.12.** Perfil de producción de  $CO_2$  (A) y consumo de  $O_2$  (B) para C2, ajustados con el modelo Logístico y el modelo de Gompertz

Se observa que al igual que en la Figura 9.11 el ajuste del modelo de Gompertz a los datos experimentales es bastante bueno (Figura 9.12). De las 15 h hasta las 20 h el ajuste del modelo Logístico presenta una caída rápida mientras que el ajuste del modelo de Gompertz presenta una caída menos pronunciada. El ajuste del modelo de Gompertz predice de manera adecuada el tiempo en el que se presenta la máxima TPC y TPO experimental. La máxima TPC y TCO experimental no presentó diferencias significativas con los valores estimados por el modelo de Gompertz. El ajuste del modelo Logístico

desplazó hasta 1 h la máxima TPC y TCO con respecto a los datos experimentales. La máxima TPC y TCO estimada por el modelo Logístico fue 1% y 4% mayor que la TPC y TPO experimental.

En la Tabla 9.9 y 9.10 se presentan los parámetros cinéticos de producción de  $\text{CO}_2$  y consumo de  $\text{O}_2$  estimados para cada modelo y el análisis estadístico para la TPC y TCO con los medios de cultivo C1 y C2.

**Tabla 9.9.** Parámetros estimados para cada modelo y análisis estadístico para C1

<b>Modelo Logístico</b>		<b>Modelo Gompertz</b>	
<i>Tasa de producción de <math>\text{CO}_2</math></i>			
$\text{CO}_{2max}$	123.03	$\text{CO}_{2max}$	128.76
$\text{CO}_{2i}$	0.01	$\beta$	229.86
$\mu_{\text{CO}_2}$	0.58	$\mu_{\text{CO}_2}$	0.37
SC	88.76	SC	32.94
$\text{R}^2$	0.938	$\text{R}^2$	0.977
<i>Tasa de consumo de <math>\text{O}_2</math></i>			
$\text{O}_{2max}$	80.90	$\text{O}_{2max}$	87.90
$\text{O}_{2i}$	0.02	$\beta$	130.98
$\mu_{\text{O}_2}$	0.54	$\mu_{\text{O}_2}$	0.33
SC	48.125	SC	20.90
$\text{R}^2$	0.936	$\text{R}^2$	0.964

**Tabla 9.10.** Parámetros estimados para cada modelo y análisis estadístico para C2

<b>Modelo Logístico</b>		<b>Modelo Gompertz</b>	
<i>Tasa de producción de <math>\text{CO}_2</math></i>			
$\text{CO}_{2max}$	116.22	$\text{CO}_{2max}$	122.51
$\text{CO}_{2i}$	0.01	$\beta$	123.26
$\mu_{\text{CO}_2}$	0.55	$\mu_{\text{CO}_2}$	0.34
SC	111.52	SC	36.94
$\text{R}^2$	0.905	$\text{R}^2$	0.967
<i>Tasa de consumo de <math>\text{O}_2</math></i>			
$\text{O}_{2max}$	78.6	$\text{O}_{2max}$	88.6
$\text{O}_{2i}$	0.04	$\beta$	64.29
$\mu_{\text{O}_2}$	0.51	$\mu_{\text{O}_2}$	0.29
SC	45.93	SC	26.11
$\text{R}^2$	0.879	$\text{R}^2$	0.942

En la Tabla 9.9 y 9.10 se observa que la menor  $SC$  se da con los datos ajustados por el modelo de Gompertz, de igual manera la  $R^2$  fue mayor con el ajuste realizado a los datos experimentales por el modelo de Gompertz debido a que la curva sigmoideal de los datos experimentales no fue simétrica. El comportamiento del ajuste de los modelos Logístico y Gompertz observado con los datos experimentales de los medios C1 y C2 fueron similares a los ajustes obtenidos para los demás datos experimentales obtenidos durante todo el trabajo experimental (ver ANEXO 1) por lo que se optó por usar los parámetros estimados por el modelo de Gompertz ya que este modelo presenta perfiles que no son simétricos y presenta un mejor ajuste con los datos obtenidos experimentalmente de las FMS usando como soporte residuos agroindustrial como es el caso de la PC, GO y BC.

### **9.3.3 Conclusiones de la evaluación del monitoreo en línea de la respirometría**

El monitoreo y captura de datos en línea del  $CO_2$ ,  $O_2$  y flujo en la FMS es importante para medir la productividad y llevar a cabo la optimización y escalamiento de los procesos.

El sistema de respirómetro desarrollado permitió la medición adecuada y precisa de la producción de  $CO_2$ , consumo de  $O_2$  y de flujo de aire, lo que permitió evaluar la evolución de la FMS proporcionando datos de buena calidad para futuros estudios.

Los valores para las tasas de producción de  $CO_2$  y consumo de  $O_2$  obtenidas a partir del modelo de Gompertz presentaron el mejor ajuste con los resultados obtenidos experimentalmente, este modelo podrá permitirnos evaluar el efecto de las variables de operación sobre parámetros cinéticos de la FMS y ampliar el conocimiento de las mismas.

Una vez desarrollada la metodología requerida se realizó la pre-selección de las cepas fúngicas que presentaran actividad pectinasa, xilanasas y celulasas. Se buscó que la CIE, enzima responsable de la hidrólisis del ACI, fuera lo más baja posible. La selección de las cepas se realizó en base a la capacidad de los extractos enzimáticos fúngicos producidos por FMS para extraer el ACI de la PC.

## 10 PRE-SELECCIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS

En este capítulo se presenta la pre-selección de las cepas fúngicas en base a su índice de potencia en cajas de Petri con PC, PCT, pectina, xilano y carboxi metil celulosa y su poca o nula ACIE y la selección de las cepas fúngicas cuyos extractos enzimáticos producidos por FMS fueron capaces de extraer el ACI sin hidrolizarlo usando PC como soporte/sustrato.

Las cepas seleccionadas fueron las que presentaron la mayor capacidad de extracción de ACI esterificado a la pared celular de la PC y la menor capacidad de biotransformar el ACI.

### 10.1 PRE-SELECCIÓN DE LAS CEPAS

A continuación se presenta la pre-selección de las cepas en base a su IP en sustratos naturales y específicos. El IP es una relación entre el diámetro del halo de aclaramiento y el diámetro de la colonia del microorganismo. Por lo que una alta actividad hidrolítica estará representada por un  $IP > 1$  (Herrera, 2003; Antier y col., 1993). Los resultados fueron analizados con ANOVA en donde se determinó si existían diferencias significativas entre los IP determinados por cada una de las cepas, las hipótesis a probar fueron:

$$H_0: \mu_i = \mu_j$$

$$H_A: \mu_i \neq \mu_j \text{ para alguna pareja } i, j$$

Donde:

$$i, j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$$

Con un nivel de significancia  $\alpha < 0.05$  se realizó la prueba de Tukey-Kramer que agrupó los IP de mayor a menor dependiendo de las diferencias significativas entre éstos. Esta prueba nos permitió determinar las cepas con mayor IP en las cajas Petri con 2g/L de PC, PCT, pectina, xilano, CM-celulosa y ACI.

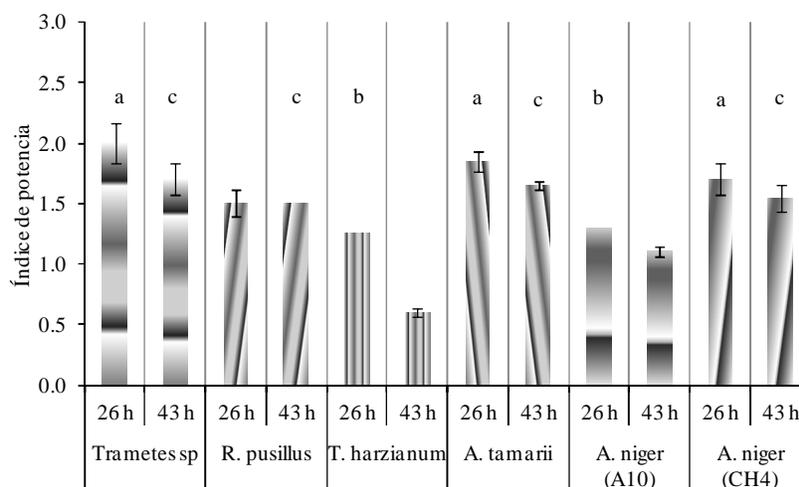
### 10.1.1 Índice de potencia con sustratos naturales: PC y PCT

#### IP en PC

Los IP de cada una de las cepas se calcularon por la relación entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia de cada una de las cepas a las 26 h y 43 h. Por lo que un  $IP > 1$  nos indicó que la actividad hidrolítica era mayor a la del crecimiento y viceversa. Nuestro interés se centró en las cepas que presentaron altos IP, debido a que con esto aseguramos que se estaban produciendo enzimas que permitían la degradación de la pared celular de la PC para la liberación del ACI.

Las cajas se revelaron con lugol para ver el halo de hidrólisis, esta solución reacciona con algunos polisacáridos formando un complejo de inclusión termolábil que se caracteriza por ser colorido, dando tonalidades diferentes al momento de que se está hidrolizando la pared celular de la PC. El azul de algodón se utilizó para ver el diámetro de la colonia debido a que éste tiñe las hifas de los hongos filamentosos al adherirse a la quitina.

En la Figura 10.1 se presenta los IP de cada una de las cepas a las 26 h y 43 h respectivamente. Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 10.1.** IP de cada cepa en cajas Petri con 2 g/L de PC incubadas durante 26 h y 43 h. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de IP entre las cepas

En la Figura 10.1 se observa que las cepas *Trametes* sp., *R. pusillus*, *A. tamaraii* y *A. niger* (CH4) fueron las que presentan  $IP > 1.5$ . Con un nivel de significancia  $\alpha$  de 0.05 la prueba de Tukey-Kramer mostró que *A. niger* (CH4), *A. tamaraii* y *Trametes* sp. presentaron el mayor IP a las 26 h de incubación con valores de 1.7, 1.9 y 2.0, respectivamente. A las 43 h de incubación el mayor IP fue para *R. pusillus*, *A. niger* (CH4), *A. tamaraii* y *Trametes* sp., con valores de 1.5, 1.6, 1.7 y 1.7.

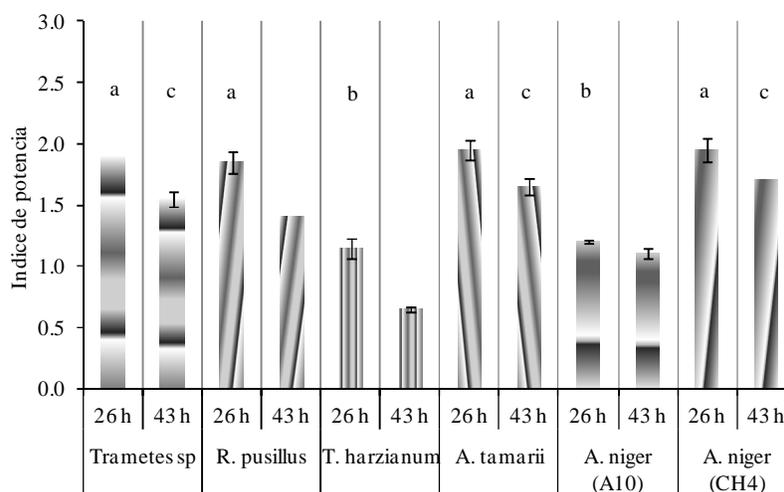
Además se observa como el IP disminuyó con el tiempo, teniendo una pérdida del IP del 52%, 15.4%, 15%, 10.8% y 8.8% para *T. harzianum*, *A. niger* (A10), *Trametes* sp., *A. tamaraii* y *A. niger* (CH4), respectivamente. *R. pusillus* mantuvo el IP de las 23h a las 43 h de incubación debido a que la proporción de los diámetros del halo de hidrólisis y del crecimiento de la cepa se mantuvieron constantes. La disminución del IP pudo deberse a que con el tiempo se fue favoreciendo el crecimiento del cultivo por lo que el diámetro de la colonia fue aumentando por la disposición de monosacáridos liberados por la hidrólisis de la pared celular de la PC. La velocidad radial (cm/h) fue de 0.043, 0.056, 0.063, 0.076, 0.088 y 0.126 para *A. niger* (A10), *A. niger* (CH4), *A. tamaraii*, *Trametes* sp., *R. pusillus* y *T. harzianum*.

*A. niger* (CH4), *A. tamaraii* y *Trametes* sp. fueron las cepas que tuvieron el mayor IP en la PC sin tratar por más de 43 h. *R. pusillus* mantuvo el IP de las 26 h a las 43 h. Posteriormente se determinaron los IP en PCT, la finalidad fue observar si se inducían las actividades despolimerizantes en una PC sin nutrientes y azúcares libres y reducir el número de cepas a pre-seleccionar.

#### IP en PCT

Se calculó los IP a las 26 h y 43 h de incubación en la PCT. El tratamiento consistió en quitar con agua caliente los nutrientes y azúcares libres de la PC, para tener un aumento en la actividad hidrolítica de las cepas en la PCT, en el tratamiento se perdieron 0.0276 g de PC/g de PCT, la PC presentó  $0.472 \pm 0.05$  mg azúcares libres/g PC, éstos fueron determinados por la técnica de DNS en el sobrenadante. Los halos de hidrólisis se revelaron con lugol y el diámetro de la colonia se midió después de agregar azul de algodón. En la

Figura 10.2 se presenta el IP para cada una de las cepas a las 26 h y 43 h de incubación. Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 10.2.** IP de cada cepa en cajas Petri con 2g/L de PCT incubadas durante 26 h y 43 h. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de IP entre las cepas

En la Figura 10.2 se observa que las cepas *Trametes sp.*, *R. pusillus*, *A. tamarrii* y *A. niger* (CH4) presentaron IP > 1.5. Mientras que *A. niger* (A10) y *T. harzianum* presentaron IP < 1.2. Con un nivel de significancia de 0.05 la prueba de Tuckey-Kramer mostró que *R. pusillus*, *A. niger* (CH4), *A. tamarrii* y *Trametes sp.* presentaron el mayor IP a las 26 h de incubación, con valores de 1.9, 1.9, 2.0 y 2.0, respectivamente. *A. niger* (CH4), *A. tamarrii* y *Trametes sp.* presentaron el mayor IP a las 43 h con valores de 1.6, 1.7 y 1.7.

El IP disminuyó con el tiempo, debido a que el crecimiento de los microorganismos se favoreció por la liberación de monosacáridos en la hidrólisis de la pared celular de la PC, lo que coincide con las etapas de crecimiento de los microorganismos. El IP disminuyó en un 43.5%, 24.3%, 18.4%, 15.4%, 12.8% y 8.3% para *T. harzianum*, *R. pusillus*, *Trametes sp.*, *A. tamarrii*, *A. niger* (CH4) y *A. niger* (A10) respectivamente. *T. harzianum* fue la cepa que presentó la mayor pérdida en el IP de las 26 h a las 43 h. Mientras que *A. niger* (A10) mantuvo su IP en el transcurso del tiempo.

El IP de las cajas con PCT fue de 1.23, 1.15 y 1.05 veces mayor al IP presente en las cajas con PC sin tratar para *R. pusillus*, *A. niger* (CH4) y *A. tamarrii*, respectivamente. El

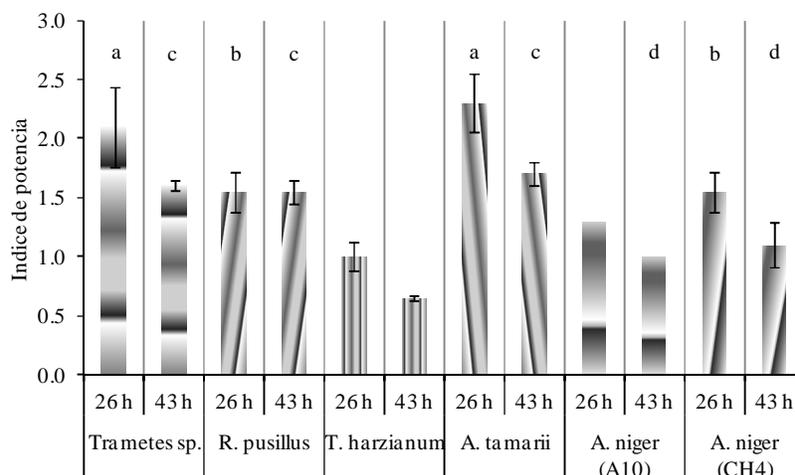
extraer los azúcares libres de la PC estimuló la producción de enzimas despolimerizantes de los microorganismos debido a que tuvieron que despolimerizar la pared celular de la PC para obtener los monosacáridos para su consumo. En el caso de *Trametes* sp., *T. harzianum* y *A. niger* (A10) no se encontraron diferencias significativas entre las cajas con 2 g/L de PC sin tratar y PCT.

Se concluyó que las cepas *A. niger* (CH4), *A. tamarii*, *R. pusillus* y *Trametes* sp. fueron las cepas que presentaron el mayor IP a las 26 h y 43 h, teniendo una disminución del IP en el transcurso del tiempo < 20%. Lo anterior coincide con lo encontrado para estas cepas en la PC sin tratar. Estas 4 cepas son relevantes debido a que el IP nos indica que son capaces de producir enzimas que hidrolizan la pared celular de la PC. La PC presenta pectina, celulosa y hemicelulosa en su pared celular por lo que en la siguiente sección será importante determinar que parte de la pared celular de la PC son capaces de hidrolizar las cepas de hongos filamentosos a partir de determinar los IP en sustratos específicos como pectina, xilano y CM-celulosa.. Siendo importante la actividad pectinolítica ya que el ACI se encuentra unido de forma covalente en mayor proporción a los monosacáridos (L-arabinosa y D-galactosa) de la pectina (Vries y Visser, 2001).

### 10.1.2 Índice de potencia con pectina, xilano y CM- celulosa

#### *IP en pectina*

La PC contiene pectina en una concentración entre 12.4 % y 6.5 % de pectina (Bressani y Braham, 1980; Ruíz-Sánchez, 2002; Antier y col., 2003). El ACI se encuentra esterificado en mayor proporción a los monosacáridos (L-arabinosa y D-galactosa) de la pectina. Para la extracción del ACI es necesario que las cepas presenten actividad pectinolítica. Esta actividad se midió en cajas Petri con pectina como sustrato a las 26 h y 43 h de incubación. Los IP de cada una de las cepas se calcularon por el cociente entre el diámetro del halo de hidrólisis y el diámetro de la colonia de cada una de las cepas. En la Figura 10.3 se muestran los IP para cada una de las cepas en cajas Petri con pectina. Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 10.3.** IP de cada cepa en cajas Petri con 2g/L de pectina incubadas por 26 h y 43 h. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de IP entre las cepas

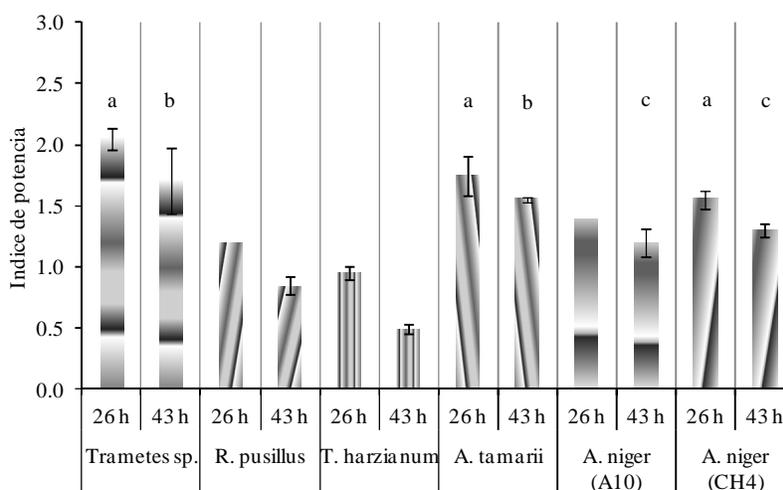
En la Figura 10.3 se observa que el  $IP > 1.5$  fue para *Trametes sp.*, *R. pusillus*, *A. tamarrii* y *A. niger* (CH4). Mientras que el  $IP < 1.5$  fue para *T. harzianum* y *A. niger* (A10). Además se observa una disminución del IP de las 26 h a las 43 h del 35%, 29%, 26.1%, 23.8%, 23.1% y 3.2% para *T. harzianum*, *A. niger* (CH4), *A. tamarrii*, *Trametes sp.*, *A. niger* (A10), *R. pusillus*. La disminución del IP fue debido a que el diámetro de crecimiento va aumentando posiblemente por la liberación de monosacáridos al ser hidrolizada la pectina. *R. pusillus* fue la cepa que presentó la menor disminución del IP.

La prueba de Tukey-Kramer mostró que el mayor IP en las cajas con 2 g/L de pectina con un nivel de significancia de 0.05 fue para *A. tamarrii* y *Trametes sp.* presentaron el mayor IP en las cajas con 2 g/L de pectina a las 26 h de incubación con valores de 2.3 y 2.1, respectivamente. Mientras que *R. pusillus*, *A. tamarrii* y *Trametes sp.* presentaron el mayor IP a las 43 h con valores de 1.5, 1.6 y 1.7, respectivamente. Se concluyó que *R. pusillus*, *A. tamarrii* y *Trametes sp.* fueron las cepas que presentaron mayor IP a las 26 h y 43 h. Además que presentan una disminución del IP  $< 26\%$  de las 26 h a las 43 h.

Es así que *A. tamarrii*, *R. pusillus* y *Trametes sp.* fueron las 3 cepas que presentan los mayores IP en las cajas Petri con sustratos naturales y pectina, por lo que podrían ser consideradas para futuros estudios.

*IP en xilano*

La PC presenta entre 0.98% y 3.23% de hemicelulosa (Molina y col., 1990; Peñaloza y col., 1985). La hemicelulosa es un polímero de pentosas, principalmente constituido de xilano por lo que se determinó la actividad xilanasa de cada una de las cepas en cajas Petri con xilano. Se midió el diámetro de los halos de hidrólisis revelados con lugol y el diámetro de la colonia, con éstos se determinó el IP. Nos interesó seleccionar las cepas que presentaron el mayor IP. A continuación en la Figura 10.4 se muestran los IP determinados a las 26 h y 43 h de cada una de las cepas. Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 10.4.** IP de cada una de las cepas en cajas Petri con 2g/L de xilano incubadas por 26h y 43h.

Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de IP entre las cepas

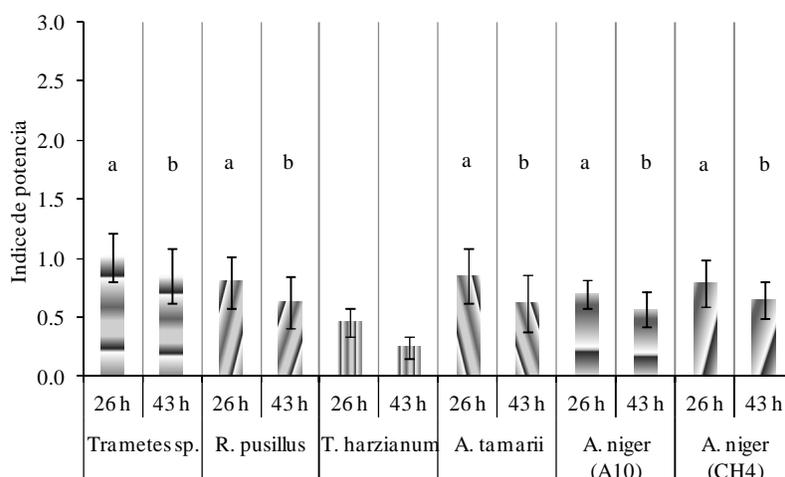
En la Figura 10.4 se observa que las cepas *Trametes sp.*, *A. tamaraii* y *A. niger (CH4)* presentaron un IP > 1.5. En la prueba de Tuckey-Kramer con un nivel de significancia de 0.05, *A. tamaraii* y *Trametes sp.* presentaron el mayor IP a las 26 h y 43 h con valores de 1.8 y 2.1 y 1.6 y 1.7, respectivamente.

Se presentó un decremento del IP a través del tiempo lo que indica un aumento en el diámetro de la colonia por la presencia de monosacáridos debido a la hidrólisis del xilano. Esta disminución fue del 47.4%, 29.2%, 22.9%, 17.1%, 16.1 y 14.3% para *T. harzianum*, *R. pusillus*, *A. tamaraii*, *Trametes sp.*, *A. niger (CH4)* y *A. niger (A10)*. *T. harzianum* presentó

el mayor decremento del IP de las 26 h a las 43 h y *A. niger* (A10) el que presentó el menor decremento del IP de las 26 h a las 43 h.

### IP en CM-celulosa

La PC contiene celulosa en una concentración entre 17.7% y 25.3% (Molina y col., 1990; Peñaloza y col., 1985). La celulosa representa la mayor fracción de los polisacáridos en la pared celular y es una larga cadena formada de monosacáridos de D-glucosa. Se determinó la actividad celulasa de cada una de las cepas en cajas Petri con CM-celulosa. Se midió el diámetro de los halos de hidrólisis revelados con lugol y el diámetro de la colonia, con éstos se determinó el IP. Se seleccionaron las cepas que presentaron el mayor IP. A continuación se muestran los IP determinados a las 26 h y 43 h de cada una de las cepas (Figura 10.5). Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 10.5.** IP de cada una de las cepas en cajas Petri con 2g/L de CM-celulosa incubadas por 26 h y 43 h. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de IP entre las cepas

En la Figura 10.5 se observa que las cepas *Trametes* sp., *R. pusillus*, *A. tamaraii* y *A. niger* (A10 y CH4) presentaron un IP > 0.5 en cajas Petri con CM-celulosa. Mientras que *T. harzianum* presentó un IP < 0.5.

Además se tuvo una disminución del IP a través del tiempo lo que indicó un aumento en el diámetro de la colonia posiblemente a la disposición de monosacáridos

debido a la hidrólisis de la CM-celulosa. Esta disminución fue del 45.7%, 27.1%, 21.3%, 18.6%, 17.7% y 15.8% para *T. harzianum*, *A. tamaritii*, *R. pusillus*, *A. niger* (A10), *A. niger* (CH4) y *Trametes* sp. *T. harzianum* presentó la mayor disminución del IP de las 26 h a las 43 h y *Trametes* sp. el que presentó la menor disminución del IP de las 26 h a las 43 h en cajas Petri con 2 g/L de CM-celulosa.

Con un nivel de significancia de 0.05 la prueba de Tukey-Kramer mostró que, *Trametes* sp. *A. tamaritii*, *R. pusillus*, *A. niger* (A10 y CH4) presentaron el mayor IP en las cajas con CM-celulosa a las 26 h de incubación con valores de 1, 0.9, 0.8, 0.8 y 0.7, respectivamente. Las mismas 5 cepas presentaron el mayor IP a las 43 h.

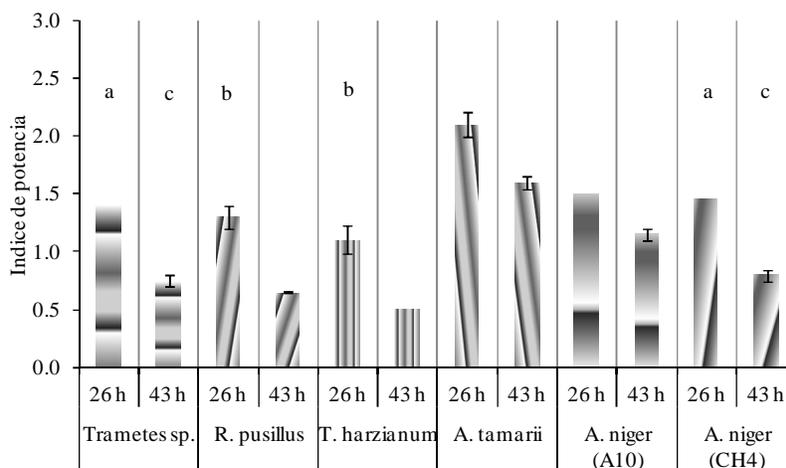
Con los resultados antes mostrados se puede observar que *Trametes* sp. y *A. tamaritii* fueron las cepas que presentaron siempre un IP mayor que las otras 4 cepas. En un nivel intermedio se encontraron *R. pusillus* y *A. niger* (CH4) y en un nivel bajo se encontraron *A. niger* (A10) y *T. harzianum*. En el siguiente apartado se determinó si las cepas fueron capaces de hidrolizar el ACI, lo cual no beneficia en el cumplimiento de los objetivos de esta tesis.

### **10.1.3 Hidrólisis del ácido clorogénico por la posible producción de la clorogenato esterasa**

El interés de este trabajo es aprovechar la PC que es un residuo agro-industrial para obtener compuestos con alto valor agregado como es el ACI. El cual se pretende extraer de manera enzimática por extractos producidos por FMS. El microorganismo que se seleccione para tal extracción deberá presentar una buena actividad despolimerizante y una baja capacidad de hidrolizar el ACI extraído. La capacidad de hidrolizar el ACI se determinó de la siguiente manera: a) En cajas Petri con 0.5 g/L de ACI y b) En tubos con 0.1 g/L de ACI. En las cajas Petri a una concentración de 0.1 g/L no se pudo determinar de manera adecuada el halo de aclaramiento.

### Hidrólisis del ACl en cajas de Petri

En la Figura 10.6 se presentan los IP para cada una de las cepas en cajas Petri con 0.5 g/L de ACl. Los ensayos se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 10.6.** IP de cada una de las cepas en cajas Petri con 0.5 g/L de ACl incubadas por 26h y 43h. Letras iguales indican que no hay diferencia significativa en los valores de IP entre las cepas

En la Figura 10.6 se observa que *A. tamaritii* y *A. niger* (CH4) presentaron el mayor IP en las cajas con ACl. Mientras que *T. harzianum*, *R. pusillus* y *Trametes* sp. presentaron menores IP. El IP disminuyó de las 26 h a las 43 h de incubación debido a que el diámetro de la colonia creció más rápido que el halo de hidrólisis, lo que indicaría que las cepas son capaces de utilizar el ACl como fuente de carbono. Palumbo y col. (2007) demostraron que los rendimientos de biomasa para *A. niger* incrementaron un 13% al pasar de un medio que tenía únicamente glucosa (100mM) como fuente de carbono a otro que presentó glucosa (100mM) y ACl (20 mM) como fuente de carbono. La prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de 0.05 mostró que *R. pusillus* y *T. harzianum* presentaron el menor IP a las 26 h y 43 h en las cajas de Petri con ACl.

En la extracción del ACl de la PC es importante que exista actividad despolimerizante y desesterificante, para poder liberar el ACl esterificado y por otro lado es importante que no se presente en mayor medida la ACIE que es la responsable de hidrolizar

el ACl libre a AC y AQ por lo que hasta el momento las cepas de *Aspergillus* no son buenas candidatas para ser utilizadas debido a su alta capacidad de hidrolizar el ACl.

#### Hidrólisis del ACl en tubos de ensaye

A continuación se muestran los resultados en los tubos con 0.1 g/L de ACl (Tabla 10.2). El porcentaje de ACl hidrolizado fue calculado de la siguiente manera:

$$\text{ACl}_{\text{hidrolizad}} (\%) = \frac{\text{ACl}_0 - \text{ACl}}{\text{ACl}_0} * 100$$

En la Tabla 10.1 se observa que *A. tamarii* hidrolizó la mayor parte del ACl seguido de *A. niger* (CH4 y A10). *R. pusillus* y *T. harzianum* fueron las cepas que hidrolizaron sólo el 12% del ACl a las 36 h de incubación.

**Tabla 10.1.** Conversión de ACl hidrolizado y rendimientos molares

	Hidrólisis de ACl (%)	$Y_{\text{AC/ACl}}$	$Y_{\text{AQ/ACl}}$
Blanco	0	-	-
<i>A. niger</i> A10	78.08 ± 0.001	0.93 ± 0.01	0.95 ± 0.02
<i>A. niger</i> CH4	69.02 ± 0.006	0.95 ± 0.02	0.95 ± 0.02
<i>A. tamarii</i>	98.17 ± 0.001	0.91 ± 0.02	0.89 ± 0.01
<i>R. pusillus</i>	12.10 ± 0.024	1.00 ± 0.00	0.85 ± 0.03
<i>Trametes</i> sp.	52.52 ± 0.004	1.00 ± 0.01	0.93 ± 0.01
<i>T. harzianum</i>	12.12 ± 0.017	1.00 ± 0.01	0.82 ± 0.03

Las mediciones se hicieron por duplicado; *Y*: Rendimiento molar

Clifford (1999) demostró que el ACl se hidroliza de manera equimolar a AC y AQ. *A. tamarii*, *A. niger* (A10 y CH4) hidrolizaron más del 60% del ACl. *Trametes* sp., *R. pusillus* y *T. harzianum* hidrolizaron de manera equimolar el ACl a AC. En la Tabla 10.1 se observa que al parecer el ACl no se transforma de manera equimolar a AQ. Los  $Y_{\text{AC/ACl}}$  y  $Y_{\text{AQ/ACl}}$  menores a 1 nos indican que los productos de la hidrólisis del ACl están siendo transformados en otros compuestos por los hongos filamentosos.

El análisis de HPLC de las alícuotas provenientes de los tubos de ensaye inoculados con *A. tamarii* y *A. niger* (A10) mostraron dos picos con tiempos de retención de 4.43 min y 5.40 min. Las alícuotas provenientes de los tubos de ensaye inoculados con *A. niger* (CH4) presentaron un pico con tiempo de retención de 4.43 min. Estos picos fueron diferentes a los picos que representaron al ACI y AC lo cual no era esperado.

El pico con tiempo de retención de 4.43 min presentó un espectro de absorción característico con máximos a los 255 y 295 nm. Estos valores coincidieron con los correspondientes al ácido protocatecoico (AP). El pico con tiempo de retención de 5.40 min presentó un espectro de absorción característico con un máximo a los 260 nm. Este compuesto no pudo ser identificado.

Smith y col. (2003) mencionaron que el AC puede ser biotransformado de manera equimolar a AP por *Acinetobacter* sp. ADP1 mediante una descarboxilación. En el caso del género *Aspergillus* no se tienen reportes que describan la biotransformación de AC a AP. Los rendimientos molares ( $Y_{PA/CA}$ ) para *A. tamarii*, *A. niger* (A10) y *A. niger* (CH4) fueron 0.91, 0.98 y 0.99 respectivamente. El  $Y_{PA/CA}$  posiblemente no tenga un valor de 1 porque el AP se está transformando a otro compuesto durante las 36 h de incubación. Esto explicaría la aparición de otro compuesto a los 5.40 min que no fue posible determinar.

Frost y col. (1998) describen la síntesis de AQ a partir de glucosa mostrando que el AQ puede ser transformado a 3-deoxi-D-arabinoheptulose-7-fosfato (3-DHAP) y 3-dehidroshiquimato (3-DHS). 3-DHAP puede ser transformado a fosfenol piruvato y eritrosa-4-fosfato. El 3-DHS puede ser usado para producir fenilalanina, tirosina y triptófano. Estos aminoácidos pueden ser usados para producir biomasa. Por lo que el  $Y_{AQ/ACI}$  de las cepas de *Aspergillus* ensayadas en este trabajo tuvieron un valor menor a 1, posiblemente debido a que el AQ presente en el medio pudo ser transformado a otro tipo de compuestos que no detectamos durante las 36 h de incubación. Esto deberá ser estudiado a fondo para determinar si el AQ puede ser usado por las cepas de *Aspergillus*.

Por lo tanto las cepas de *Aspergillus* no son buena opción para ser usadas en la extracción del ACI presente en la PC, pues transforman el ACI en otros compuestos e incluso

utilizarlo como fuente de carbono. A continuación se presentan las conclusiones parciales de la pre-selección de las cepas.

#### **10.1.4 Conclusiones de la pre-selección**

Con los resultados antes mostrados concluimos que las cepas pre-seleccionadas fueron *A. tamarii*, *R. pusillus* y *Trametes* sp. Las cepas *A. tamarii* y *Trametes* sp. presentaron los mayores valores del IP en las cajas Petri con PC, PCT, pectina, xilano y CM-celulosa por lo probablemente produzcan las enzimas despolimerizantes necesarias para extraer el ACI esterificado a la pared celular de la PC. Sin olvidar que estas dos cepas presentaron los mayores IP en las cajas de Petri con ACI y que *A. tamarii* (98%) fue la cepa que más hidrolizó ACI en los tubos de ensaye en comparación con las demás cepas ensayadas. Lo que podría producir pérdidas en la extracción del ACI esterificado a la PC por la hidrólisis del mismo.

Por otro lado *R. pusillus* presentó un nivel intermedio del valor del IP en las cajas de Petri con PC, PCT, pectina, xilano y CM-celulosa. Además fue una de las cepas que presentaron el menor IP en cajas de Petri con ACI y la menor capacidad de hidrolizar el ACI en los tubos de ensayo en comparación con las demás cepas ensayadas. Lo que beneficiaría no tener pérdidas del ACI extraído de la por la hidrólisis del mismo.

*A. niger* (A10) y *T. harzianum* presentaron los menores valores de IP en cajas de Petri con PC, PCT, pectina, xilano y CM-celulosa y *A. niger* (CH4) presentó un nivel intermedio del valor del IP. Las dos cepas de *Aspergillus* se encontraron entre las cepas que hidrolizaron la mayor cantidad de ACI en las cajas de Petri y tubos de ensaye con ACI, probablemente estas cepas no son buenas candidatas para ser usadas para extraer el ACI presente en la PC, pues lo transforman en otros compuestos. Por otro tanto las cepas de *A. niger* (A10) *A. niger* (CH4) y *T. harzianum* fueron descartadas del estudio.

En la siguiente sección se presenta la selección de las cepas en la cual se evaluó si los extractos enzimáticos producidos por FMS fueron capaces de extraer el ACI esterificado a la pared celular de la PC sin hidrolizarlo.

## 10.2 SELECCIÓN DE LAS CEPAS

En esta sección se muestran los resultados de la selección de las cepas a partir de la producción de enzimas necesarias para degradar la pared celular de la PC para posteriormente evaluar cuál extracto enzimático fue capaz de extraer el ACI de la PC sin hidrolizarlo.

La producción de los extractos enzimáticos se realizó en cultivo en matraces y en columnas para las cepas pre-seleccionadas *A. tamarii*, *R. pusillus*, *Trametes* sp. usando PC como soporte/sustrato por duplicado. El cultivo en matraces se utilizó para evaluar si las cepas eran capaces de crecer en la PC sin ninguna otra fuente de carbono a partir de producir enzimas que degradaran la pared celular de la PC. El cultivo en columnas se utilizó para evaluar el efecto de inducir la producción de la FAE en los extractos enzimáticos sobre la extracción del ACI. Faulds en el 2010 menciona que la CIE y la FAE son la misma enzima, ya que la FAE puede hidrolizar el ACI a AC y AQ. Sin embargo, Asther y col. (2005) observa en extractos enzimáticos producidos por *A. niger* en bagazo de caña que se producen dos tipos de enzimas: FAE tipo B y la CIE. La FAE tipo B no presentó actividad CIE y viceversa.

Además se determinó la cantidad de ACI y AH presentes en la PC durante la fermentación en matraces y en columnas.

### 10.2.1 Producción de los extractos enzimáticos por fermentación en matraces y en columnas

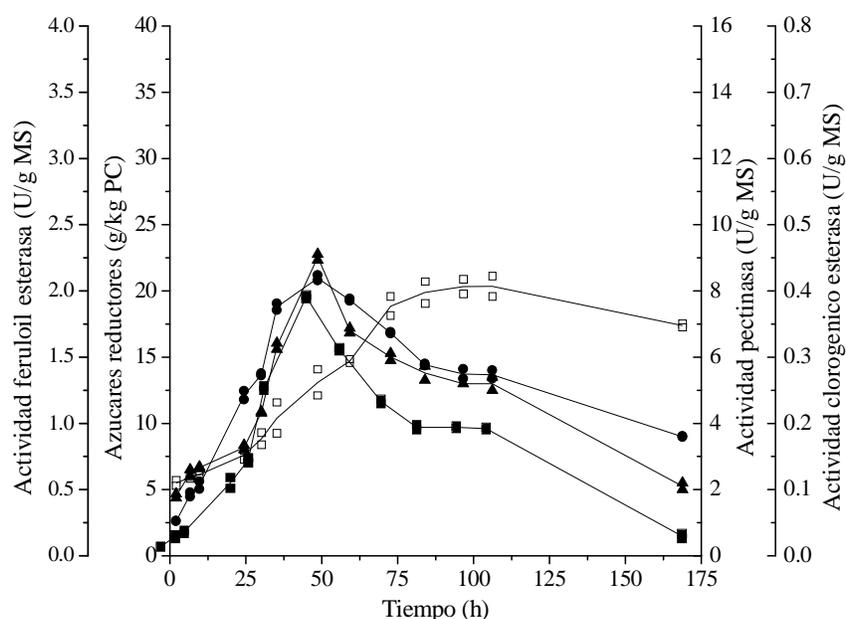
#### 10.2.1.1 Fermentación en matraces

Las 3 cepas pre-seleccionadas en la etapa anterior fueron estudiadas en fermentación en matraces usando PC como sustrato, el propósito fue evaluar la producción de enzimas necesarias para degradar la pared celular de la PC para posteriormente extraer el ACI. A continuación se muestran los perfiles de actividad enzimática de la pectinasa, la FAE y la CIE para las cepas de *R. pusillus*, *Trametes* sp. y *A. tamarii*.

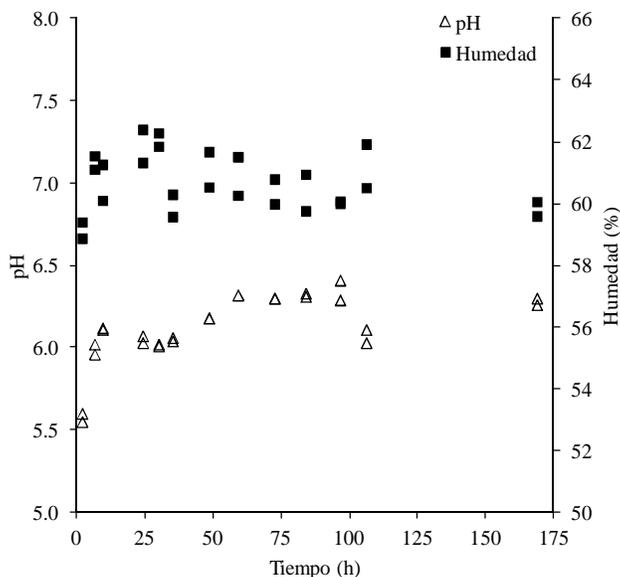
### Cultivo de *R. pusillus*

En la Figuras 10.7 y 10.8 se muestran los perfiles de actividad enzimática de *R. pusillus*, pH y contenido de humedad medidos durante la fermentación en matraces con *R. pusillus*.

El perfil de actividades enzimáticas de la pectinasa, la FAE y la CIE para *R. pusillus*, se presenta en la Figura 10.7. La mayor actividad enzimática de estas 3 enzimas se alcanzó al mismo periodo de tiempo (49 h), el perfil de la actividad de la FAE y de la CIE fue similar lo que nos hace pensar que probablemente se trate de la misma enzima (Faulds, 2010). Además, Asther y col. (2005) demuestran que la CIE se produce al mismo tiempo que las cinamoil esterases que presentan actividad sobre metil cafeato, metil ferulato, metil *p*-cumarato y metil sinapato para cepas de *A. niger*. Se observa que todas las actividades enzimáticas decrecen pasadas las 50 h de cultivo antes de que empiece a decrecer la concentración de los azúcares reductores presentes en la PC.



**Figura 10.7.** Perfil de actividades enzimáticas de *R. pusillus*. Azúcares reductores (□), actividad FAE (■), actividad CIE (▲), actividad pectinolítica (●)



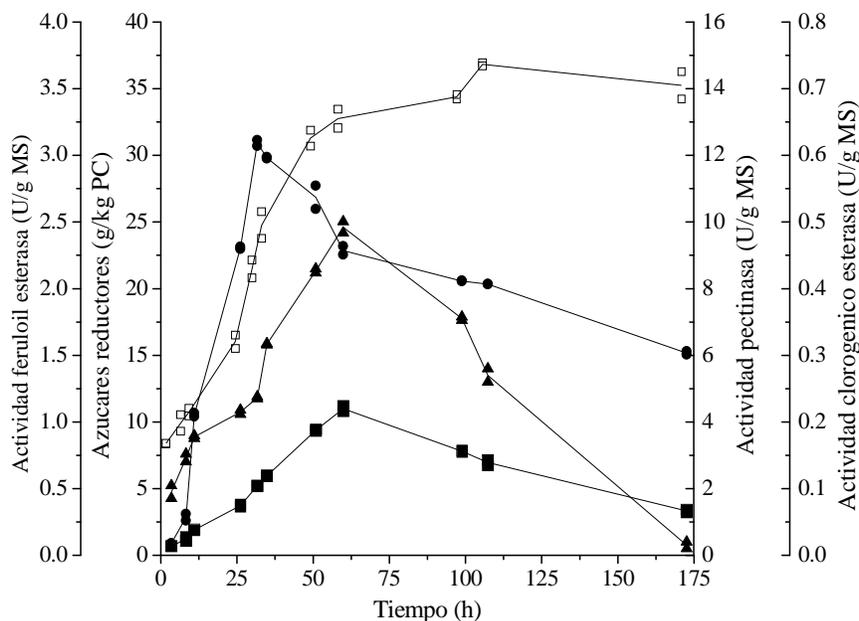
**Figura 10.8.** Contenido de humedad y pH en la fermentación en matraces con *R. pusillus*

En la Figura 10.8 se observa que el contenido de humedad presentó valores próximos al 60% durante las 175 h que duró la fermentación. El pH al inicio de la fermentación fue de 5.6, después de 10 h de cultivo empezó a incrementar hasta llegar a un valor de 6.4 a las 100 h de cultivo. De las 100 h a las 175 h de cultivo el pH permaneció constante. El pH tiende a aumentar si compuestos amino orgánicos son desaminados al ser usados para el crecimiento microbiano. También el pH aumenta por el consumo de los ácidos orgánicos que estaban presentes en el medio de cultivo.

#### Cultivo de *Trametes* sp.

En la Figuras 10.9 y 10.10 se muestran los perfiles de actividad enzimática de, de pH y de contenido de humedad medidos durante la fermentación en matraces con *Trametes* sp.

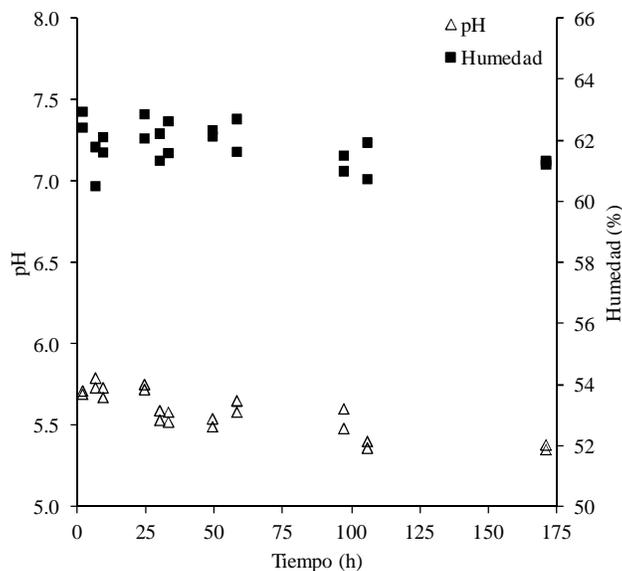
En la Figura 10.9 se presenta el perfil de actividades enzimáticas de *Trametes* sp. La mayor actividad de la FAE y de la CIE se alcanzó a las 28 h después de presentarse la mayor actividad de la enzima pectinasa. La actividad enzimática de la pectinasa, FAE y CIE fue aumentando conforme *Trametes* sp. fue liberando azúcares reductores de la pared celular de la PC y consumiendo los monosacáridos liberados.



**Figura 10.9.** Perfil de actividades enzimáticas de *Trametes sp.* Azúcares reductores (□), actividad FAE (■), actividad CIE (▲), actividad pectinolítica (●)

La actividad de la enzima pectinasa empezó a disminuir antes de que la liberación de azúcares reductores (ácido galacturónico, glucosa) terminara y se mantuvo constante hasta las 175 h de cultivo. Esto sugiere que podría existir represión catabólica inducida por la cantidad de azúcares reductores presentes en el medio como glucosa y fructosa que son los principales represores de los sistemas pectinolíticos (Vries, 2003). Esto mismo se observó para *R. pusillus*.

La actividad de la FAE y CIE empezaron a disminuir cuando la liberación de azúcares se mantuvo constante, esto podría ser por efecto de la represión catabólica por parte de los azúcares reductores liberados como la glucosa y la fructosa (Faulds y Williamson, 1999). Este mismo efecto se observó para *R. pusillus*. Se observa una caída pronunciada en ambas actividades enzimáticas hasta llegar casi a cero a las 175 h de fermentación. Estos resultados sugieren que se podría tratar de una enzima que presenta las dos actividades enzimáticas.



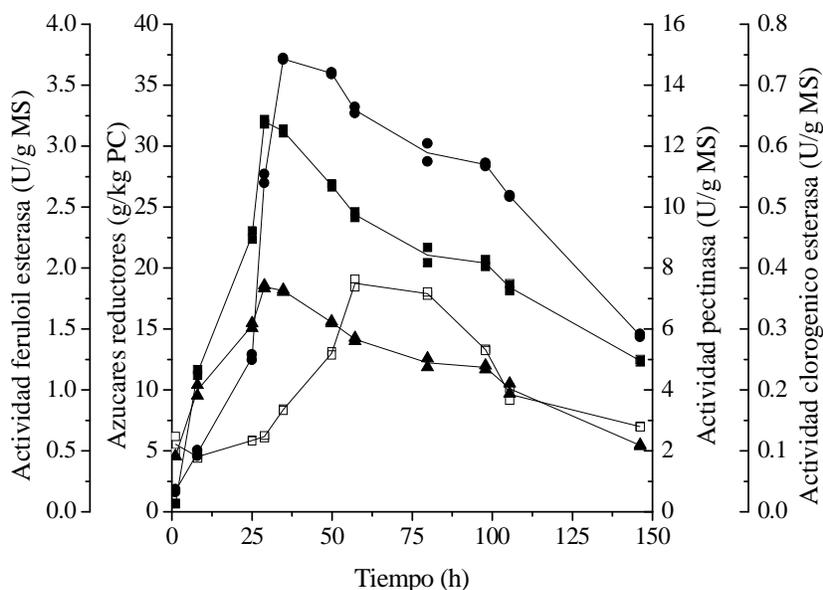
**Figura 10.10.** Contenido de humedad y pH en la fermentación en matraces con *Trametes* sp.

En la Figura 10.10 se observa que el contenido de humedad, durante las 175 h de la fermentación tuvo valores próximos al 62%. El pH al inicio de la fermentación fue de 5.7 y empezó a disminuir hasta alcanzar un valor de pH de 5.4 a las 175 h de fermentación. La disminución del pH se puede explicar por la síntesis y liberación de ácidos orgánicos durante el cultivo. En comparación con el cultivo de *R. pusillus* el perfil de pH fue diferente al presentado en el cultivo de *Trametes* sp. En el cultivo *R. pusillus* el pH permaneció alrededor de 6.4 y la actividad pectinolítica empezó a decrecer pasadas las 50 h de cultivo, mientras que en el cultivo de *Trametes* sp. la actividad de la pectinasa empezó a decrecer pasadas las 30 h de cultivo.

Malvessi y Moura da Silva (2004), encontraron que si mantenían el medio de cultivo entre un pH de 3 y 4 aumentaba considerable la producción de la enzima poligalacturonasa de *A. oryzae*, ya que al aumentar o disminuir más el pH se perdía considerablemente la actividad enzimática. En nuestro caso la pérdida de la actividad de la pectinasa en los cultivos de *Trametes* sp. pudo deberse al cambio de pH de 5.7 a 5.4.

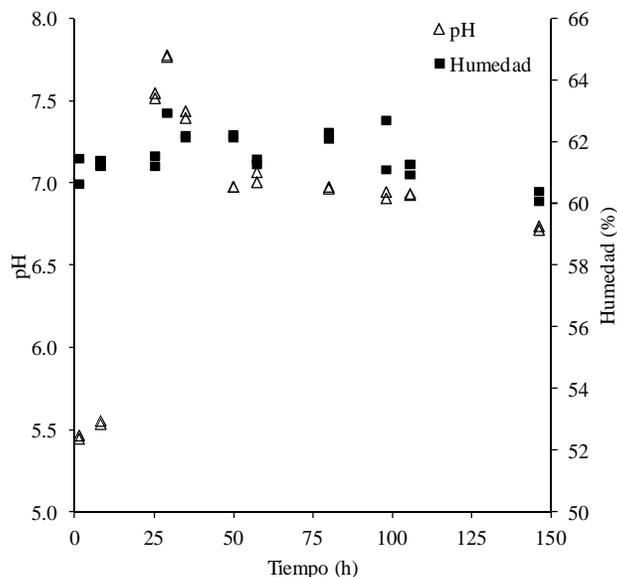
### Cultivo de *A. tamarii*

En la Figura 10.11 se muestra el perfil de actividades enzimáticas de *A. tamarii*. La mayor actividad de la FAE y de la CIE se presentó 6 h antes de alcanzar la mayor actividad de la enzima pectinasa. El que la FAE y la CIE presenten el mismo perfil de actividad enzimática ya ha sido reportado para cepas de *Aspergillus* por Asther y col. (2005). Todas las actividades enzimáticas fueron incrementando conforme aumentó la cantidad de azúcares reductores en el medio de fermentación. Tanto la actividad FAE y CIE empiezan a decaer después de las 26 h de fermentación, mucho antes de que empiece a decrecer la liberación de azúcares reductores, esto mismo se observó para los cultivos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. El perfil de la actividad pectinasa presentó similitud con el perfil de liberación de azúcares reductores ya que cuando empieza a disminuir la cantidad de azúcares reductores también empieza a decrecer la actividad de la enzima pectinasa, esto se debe probablemente a que entre los azúcares reductores liberados se encontraba el ácido galacturónico, responsable de la inducción de la enzima pectinasa (Vries, 2003).



**Figura 10.11.** Perfil de actividades enzimáticas de *A. tamarii*. Azúcares reductores (□), actividad FAE (■), actividad CIE (▲), actividad pectinolítica (●)

En la Figura 10.12 se presenta el contenido de humedad y pH durante las 150 h de la fermentación en matraces con *A. tamarii*.



**Figura 10.12.** Contenido de la humedad y pH en la fermentación en matraces con *A. tamarii*

Se observa que el contenido de humedad durante las 150 h que duró el cultivo tuvo valores próximos al 62%. El pH al inicio de la fermentación fue de 5.5, después de 10 h de cultivo el pH empezó a incrementar hasta que llegó a un valor de pH de 7.8. Después de 35 h de cultivo el pH empezó a disminuir hasta alcanzar un valor de pH de 6.7 a las 150 h de fermentación. El perfil de pH presentó un comportamiento similar al que presentó el cultivo de *R. pusillus* pero más alcalino al final. El pH tiende a aumentar por el consumo de ácidos orgánicos presentes en el medio de cultivo. La disminución del pH coincidió con el máximo de la actividad FAE y CIE, por lo que es probable que la liberación de AH debida a estas enzimas afectara el pH del cultivo, también la liberación de otros ácidos orgánicos presentes en el cultivo afecta el pH.

En los resultados antes mostrados se observa que las 3 cepas de hongos filamentosos fueron capaces de crecer en PC. Las enzimas FAE y CIE presentaron perfiles similares en todos los cultivos en matraces, lo que sugiere que probablemente se trate de la misma enzima (Faulds, 2010). Además, Asther y col. (2005) demuestran que la producción de la CIE por cepas de *Aspergillus* se da al mismo tiempo que las cinamoil esterases que presentan actividad sobre sustratos metilados de los AH. Este fenómeno no ha sido reportado para *R. pusillus* y *Trametes* sp. por lo que deberá ser corroborado más adelante si la FAE y CIE son o no la misma enzima. El pH del medio de cultivo afectó de manera

considerable la actividad de la enzima pectinasa. Se pudo observar el efecto de la represión catabólica por parte de los azúcares reductores (ácido galacturónico, glucosa, fructosa) sobre la producción de las enzimas.

En la Tabla 10.2 se presenta la máxima actividad de la pectinasa, CIE y FAE para las 3 cepas de hongos filamentosos ensayados.

**Tabla 10.2.** Actividades enzimáticas máximas medidas durante la fermentación en matraces para las 3 cepas ensayadas

Cepa	Pectinasa		CIE		FAE	
	Tiempo (h)	Actividad (U/g MS)	Tiempo (h)	Actividad (U/g MS)	Tiempo (h)	Actividad (U/g MS)
<i>A. tamaritii</i>	34	14.9 ± 0.01	28	0.37 ± 0.001	28	3.2 ± 0.02
<i>R. pusillus</i>	49	8.4 ± 0.1	49	0.46 ± 0.01	49	2.0 ± 0.02
<i>Trametes</i> sp.	30	12.4 ± 0.1	58	0.49 ± 0.01	58	1.1 ± 0.02

Las mediciones se hicieron por cuadruplicado

*A. tamaritii* presentó la mayor actividad de la pectinasa y la FAE. Mientras que *Trametes* sp. presentó la mayor actividad de la CIE. Por otra parte *Trametes* sp. alcanzó la máxima actividad pectinasa 4 h y 19 h antes que *A. tamaritii* y *R. pusillus*, respectivamente.

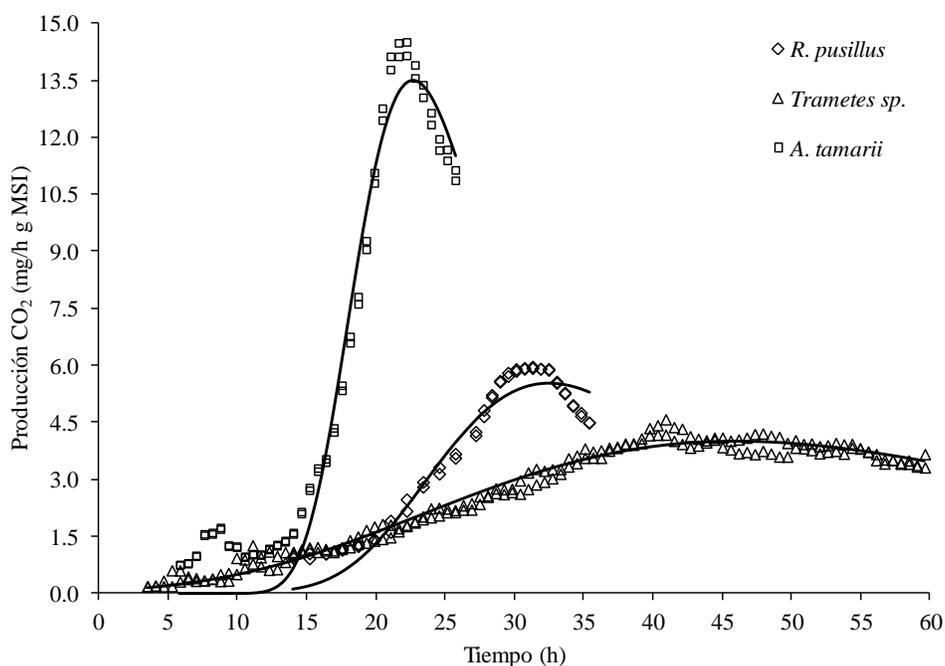
Las 3 cepas pre-seleccionadas fueron capaces de crecer en la PC sin ninguna otra fuente de carbono. Sin embargo, todas las cepas presentaron la producción de la CIE enzima responsable de hidrolizar el ACL a AC y AQ. Se observó que *A. tamaritii* presentó la mayor actividad FAE pero no la mayor actividad CIE.

Las enzimas FAE y CIE presentaron los mismos perfiles de actividad enzimática para las 3 cepas ensayadas. Por lo que aún no se puede decir si se trata de la misma enzima. El cultivo en columnas que se presenta a continuación se utilizó para evaluar el efecto de inducir la producción de la FAE en los extractos enzimáticos sobre la inducción de la ACIE y la extracción del ACL.

### 10.2.1.2 Fermentación en columnas

En esta etapa de selección se realizó la fermentación en columnas. Se agregó medio de Asther y col. (2002) diluido al 50%, que es reportado como un medio que promueve la producción de la enzima FAE. En el momento que se alcanzó la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> (TPC) se tomó una muestra para obtener el extracto enzimático, ya que en este momento el hongo se encuentra en fase exponencial, posiblemente con poca producción de proteasas y con títulos enzimáticos elevados de las enzimas de interés.

En la Figura 10.13 se presenta la producción de CO<sub>2</sub> para las 3 cepas pre-seleccionadas. Los cultivos de *A. tamaritii* y *R. pusillus* mostraron un primer pico de TPC a las 9 h y 12 h, respectivamente. Oriol y col. (1987) mostraron que en fermentaciones en medio sólido (FMS) usando a *A. niger*, el primer pico de TPC puede estar asociado con la fase de transición entre la germinación y el crecimiento apical. Este fenómeno ha sido reportado sólo para cepas de *Aspergillus* pero no para *R. pusillus*.



**Figura 10.13.** Producción de CO<sub>2</sub> para las cepas seleccionadas. La línea continua representa el modelo ajustado de Gompertz

El máximo TPC en la FMS fue para la cepa de *A. tamaritii* después de 22 h de cultivo. Este valor de TPC fue 3.3 y 2.4 veces mayor que las TPC encontradas para, *Trametes* sp. y *R. pusillus*, respectivamente. El máximo TPC para, *R. pusillus* y *Trametes* sp. se presentó a las 31 h y 41 h de cultivo, respectivamente. La cantidad de CO<sub>2</sub> total producido fue de 254.9, 180.6 y 140.5 mg CO<sub>2</sub> g MSI para *Trametes* sp. (59 h), *A. tamaritii* (26 h) y *R. pusillus* (35 h), respectivamente.

La pérdida de materia seca inicial (PMSI) medida por gravimetría fue 18.2%, 12.7% y 10.1% para *Trametes* sp., *A. tamaritii* y *R. pusillus*, respectivamente. La PMSI estimada a partir de la producción de CO<sub>2</sub> fue de 17.3%, 12.3% y 9.5%, respectivamente. Con la ecuación estequiométrica de la oxidación de hexosas (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) y la producción de CO<sub>2</sub> se determinó la cantidad teórica de hexosas consumidas y la PMSI. La diferencia entre la materia seca final e inicial resulta en la determinación de la PMSI. Cada columna de fermentación tuvo aproximadamente 12 g de MSI. Las variaciones entre la PMSI por gravimetría y estimadas a partir de la producción de CO<sub>2</sub> pueden deberse a que la producción de biomasa y de otros productos de la fermentación no son considerados en la ecuación estequiométrica de la oxidación de las hexosas.

El contenido de humedad y actividad de agua ( $a_w$ ) al inicio y al final fueron prácticamente iguales (59% y 0.997, respectivamente). La  $a_w$  se expresa como el cociente de presiones entre la presión parcial de vapor generado por el agua del medio de cultivo y la presión parcial de vapor del agua pura a las mismas condiciones.

El pH inicial del medio se ajustó a 6. Al final de cada una de las fermentaciones el pH fue de 5.8, 5.2 y 5.0 para los cultivos de *Trametes* sp., *R. pusillus* y *A. tamaritii*, respectivamente. En todos los casos la disminución del pH puede deberse a la producción de ácidos orgánicos y a la posible liberación de AH por la enzima FAE que se está produciendo durante la FMS.

La actividad respiratoria del cultivo ( $\mu_{CO_2}$ ) fue estimada al ajustar el modelo de Gompertz y el modelo Logístico con los datos experimentales de producción de CO<sub>2</sub>. El mejor ajuste lo presentó el modelo de Gompertz con coeficientes de R<sup>2</sup> de 0.96, 0.97, 0.98

para la TPC de *R. pusillus*, *Trametes* sp. y *A. tamaraii*, respectivamente. La  $\mu_{CO_2}$  se considera como una medida indirecta de la actividad metabólica durante el crecimiento de los microorganismos en la FMS de las 4 cepas ensayadas.

En la Tabla 10.3 se presenta la  $\mu_{CO_2}$  estimada a partir del modelo de Gompertz y la actividad de la enzima FAE medida al momento de presentarse la máxima TPC de cada una de las cepas ensayadas.

**Tabla 10.3.** La  $\mu_{CO_2}$  estimada y las actividades FAE y CIE medidas en extractos enzimáticos producidos por FMS para cada una de las cepas ensayadas

Cepa	$\mu_{CO_2}$ (h <sup>-1</sup> )	Actividad CIE (U/g MS)	Actividad FAE (U/g MS)	Soporte/sustrato	Referencias
<i>A. tamaraii</i> *	0.20	2.7 ± 0.02	20.6 ± 0.10	Pulpa de café	En este trabajo
<i>R. pusillus</i> *	0.11	1.3 ± 0.10	13.5 ± 0.05	Pulpa de café	En este trabajo
<i>Trametes</i> sp.*	0.04	2.1 ± 0.05	7.8 ± 0.10	Pulpa de café	En este trabajo
<i>Rhizopus</i> sp. (C16)			1	Pulpa de café	Ramírez y col.
<i>A. niger</i>			32.5	Salvado de trigo	Hegde y col.
<i>A. niger</i>			0.8	Pulpa de remolacha azucarera	Asther y col.
<i>A. niger</i> (CFR1105)			10.8	Trigo	Bartolomé y col.

\*Las mediciones se hicieron por duplicado y cuadruplicado

En la Tabla 10.3 se observa que el cultivo de *A. tamaraii* presentó la mayor  $\mu_{CO_2}$ . Mientras que *Trametes* sp. presentó la menor  $\mu_{CO_2}$ . En todas las cepas estudiadas la máxima actividad de la FAE y CIE se alcanzó cuando se alcanzó la mayor producción de CO<sub>2</sub>. *A. tamaraii* presentó la mayor actividad de la FAE y *Trametes* sp. la menor actividad de la FAE de las cuatro cepas ensayadas. Se observó un aumento en la actividad de la FAE expresada en los extractos enzimáticos producidos por fermentación en columnas de 7.1, 6.8 y 6.4 veces en comparación con la actividad de la FAE expresada en los extractos enzimáticos producidos por fermentación en matraces de *Trametes* sp., *R. pusillus* y *A. tamaraii*, respectivamente. Esto se debe a la maltosa utilizada como fuente de carbono inductora de la

FAE, a que hay una mejor remoción de calor metabólico y un mejor intercambio gaseoso en la fermentación en columnas que en la fermentación en matraces.

La actividad FAE de los 3 extractos enzimáticos de los 4 hongos ensayados fue mayor a la reportada por Asther y col. (2002) y Ramírez y col. (2008) y menor a la reportada por Hegde y col. (2006); mientras que la actividad FAE reportada por Bartolomé y col. (1997) fue similar a la actividad FAE de *R. pusillus* y *A. niger* CH4 (Tabla 10.3).

Por otro lado se tiene que la mayor ACIE la presentó el extracto de *A. tamarii*. Mientras que *R. pusillus* presentó la menor ACIE. Faulds en el 2010 mencionó que la CIE y la FAE son la misma enzima, ya que la FAE puede hidrolizar el ACI a AC y AQ. Asther y col. (2005) mencionó que la CIE y la FAE son dos enzimas diferentes debido a que en extractos enzimáticos producidos por *A. niger* en bagazo de caña determinaron que la FAE tipo B no tiene ACIE y la CIE no tiene actividad FAE. En los resultados antes mostrados (Tablas 10.2 y 10.3) se observó un aumento en la ACIE en los extractos producidos por la fermentación en columnas de 7.3, 4.3 y 2.8 veces con respecto a la ACIE en los extractos producidos por fermentación en matraces para *A. tamarii*, *Trametes* sp. y *R. pusillus*. Sin embargo, mientras que en los extractos producidos por fermentación en matraces *Trametes* sp. presentó la mayor ACIE, en los extractos producidos por fermentación en columnas la mayor ACIE la presentó *A. tamarii*. Es probable que algunas cepas produzcan enzimas FAE que presenten la ACIE como la FAE tipo C (Crepin y col., 2004), mientras que otras cepas producen dos enzimas una con actividad FAE y otra con ACIE. En futuros experimentos será interesante determinar la relación entre la FAE y la CIE.

La cepa *R. pusillus* es la que presentó la menor ACIE responsable de la hidrólisis del ACI en los extractos enzimáticos producidos por las fermentaciones en matraces y en columnas con respecto a las otras dos cepas, sin embargo hay que evaluar su capacidad para extraer el ACI esterificado de la PC. En las siguientes secciones se presentan los resultados de la extracción del ACI por los extractos enzimáticos producidos por fermentación en matraces y en columnas. Así como la cantidad de ACI y de AH en la PC y la PCF por cada una de las cepas.

### 10.2.2 Extracción enzimática del ácido clorogénico

En el trabajo experimental desarrollado durante la maestría se determinó la cantidad de ACI y AH esterificados a la pared celular de la PC (Tabla 10.4), estas concentraciones variaron entre un 5% y 10% en la PC utilizada durante todo el trabajo experimental desarrollado.

**Tabla 10.4.** Concentración de ACI y AH en la pulpa de café (Torres-Mancera y col., 2011)

	ACI (mg/kg)	AC (mg/kg)	AF (mg/kg)	ApC (mg/kg)
<b>Totales<sup>a</sup></b>	3097 ± 3.5	1985 ± 3.6	113 ± 4.7	81 ± 6.0
<b>Esterificados<sup>b</sup></b>	2382.8 ± 4.5	1873.1 ± 4.5	83 ± 5.8	78.7 ± 5.9
<b>Libres<sup>c</sup></b>	714.2 ± 4.7	111.9 ± 4.9	30 ± 7.0	-

<sup>a</sup> Hidrólisis alcalina NaOH 2 M, 2 h, 50 °C, 100 rpm

<sup>b</sup> Diferencia entre los fenoles totales y los fenoles libres

<sup>c</sup> Extracción metanol al 80%, 30 min, 40°C, 100 rpm

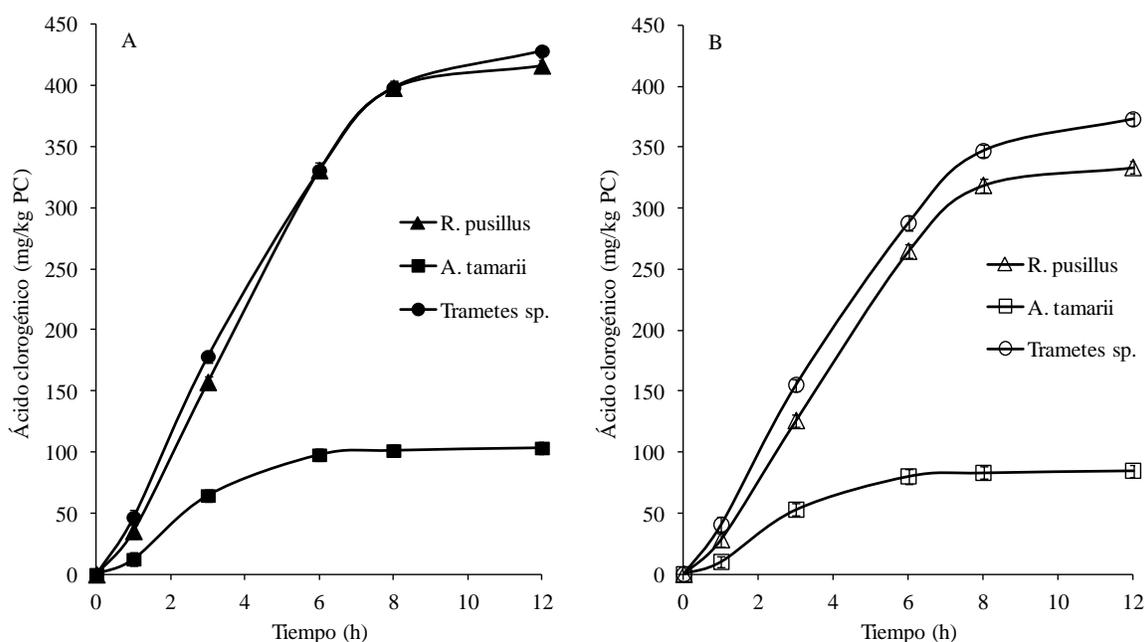
La cantidad de AC, AF y ApC totales, se encuentra dentro del rango de los valores reportados para estos AH que es de 1600 a 3100 mg de AC/kg de PC; de 100 a 240 mg de AF/kg de PC y de 80 mg de ApC/kg de PC (Benoit y col., 2006; Roussos y col., 1995; Ruiz-Sánchez, 2002). El ACI total es uno de los compuestos más abundantes en la PC. La cantidad de ACI determinado se encontró por debajo del rango reportado por Labat y col. (2000) que es de 3600 a 7000 mg/kg de PC. Probablemente, el ACI esterificado al formar enlaces éster con la celulosa, hemicelulosa y pectina aumenta la resistencia de la pared celular de ser degradada por los microorganismos (Kroon y Williamson, 1999)

Cabe destacar que la proporción de ACI y AF esterificados es del 76.9% y 73.4% respectivamente, mientras que prácticamente todo el AC (94.4%) y el ApC (97.2%) se encuentra esterificado en la pared celular de la PC, lo que no puede ser comparado con datos de la literatura ya que no se han encontrado reportes sobre la cantidad de AH esterificados y libres en la pared celular de la PC.

Los resultados de la extracción enzimática del ACI y los AH por los extractos producidos por la fermentación en matraces no se presentan puesto que las cantidades

obtenidas presentaron un gran error experimental y en muchas ocasiones no pudo ser detectado adecuadamente el ACl y AH.

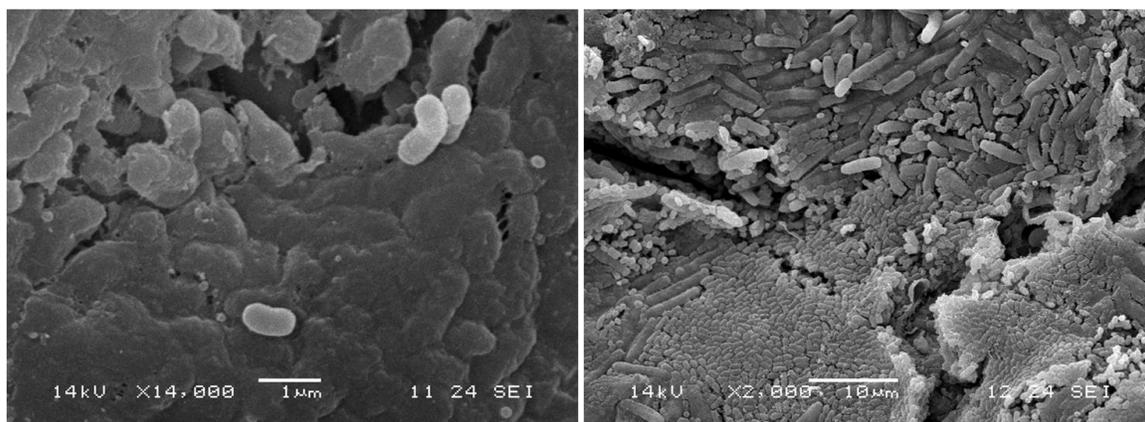
La extracción enzimática se realizó en la oscuridad a 30°C y 40°C con agitación continua (100 rpm). Se tomaron muestras a las 0 h, 3 h, 6 h, 8 h y 12 h de reacción. En la Figura 10.14 se presenta la extracción enzimática realizada con los extractos producidos por *R. pusillus*, *Trametes sp.* y *A. tamaraii* por fermentación en columnas.



**Figura 10.14.** Extracción enzimática del ACl esterificado por los extractos enzimáticos producidos por *R. pusillus*, *Trametes sp.* y *A. tamaraii* a 40°C (A) y 30°C (B)

En la Figura 10.14 se observa que de las 0 h a las 8 h de reacción, la cantidad de ACl extraído fue incrementando de manera lineal con respecto al tiempo. Mientras que de las 8 h a las 12 h el incremento del ACl esterificado no fue significativa ( $\alpha < 0.001$ ) por lo que permaneció prácticamente constante. Se observa que al pasar de una temperatura de incubación de 30°C a 40°C hay un incremento del 20% aproximadamente en la liberación del ACl esterificado a la pared celular de la PC. El extracto enzimático obtenido por *A. tamaraii* extrajo la menor cantidad de ACl. Es así que se determinó que las condiciones de extracción enzimática fueran 40°C por 8 h a 100 rpm.

Además, al volumen de reacción se le agregó 0.02% de cefalosporina (J.T. Baker, México) la cual, es una clase de antibióticos beta-lactámicos. Se agregó debido a que la PC presentó una gran cantidad de bacterias como fauna nativa. Lo cual se observó en la imagen de microscopia que se realizó (Figura 10.15).



**Figura 10.15.** Microscopia de la PC utilizada

En la Tabla 10.5 se presentan los resultados de la extracción enzimática del ACI y los AH con los diferentes extractos enzimáticos obtenidos durante la fermentación en columnas de las 3 cepas ensayadas. Además se presentan los resultados de extracción de ACI y AH obtenidos de hacer mezclas de los extractos enzimáticos de *R. pusillus*, *Trametes* sp. y *A. tamaritii*. La finalidad fue determinar si la mezcla de extractos enzimático favorecía la extracción del ACI. La extracción enzimática se llevó a cabo en la oscuridad a 40°C y 100 rpm por 6 h y 8 h de reacción.

Se observa que a las 8 h de reacción se extrajo la mayor cantidad de ACI para los extractos enzimáticos de *R. pusillus*, *Trametes* sp. y las mezclas de los extractos enzimáticos. No se presentaron diferencias significativas en la extracción enzimática del ACI entre las 6 h y 8 h de reacción para el extracto de *A. tamaritii* (Tabla 10.5). Esto se debe a que *A. tamaritii* como se mostró anteriormente puede hidrolizar rápidamente del ACI a AC y AQ por lo que a las 6 h y 8 h de reacción no podemos determinar cuándo del ACI ha sido extraído.

Para el caso del AC, se extrajo una mayor cantidad a las 8 h de reacción para los extractos enzimáticos de *A. tamaritii* y las mezclas de los extractos enzimáticos. No se

observaron diferencias significativas en la extracción del AC entre las 6 h y 8 h de reacción para los extractos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. (Tabla 10.5), probablemente estos dos extractos no tienen las enzimas necesarias para llevar a cabo la extracción de AC.

Además, el extracto de *A. tamaritii* fue el único que presentó diferencias significativas entre las 6 h y 8 h de reacción para la extracción enzimática del AF. Lo cual nos hace pensar que *A. tamaritii* produce las enzimas necesarias para extraer el AF esterificado.

En el caso del ApC no se observaron diferencias significativas entre las 6 h y 8 h de reacción para todos los extractos enzimáticos ensayados (Tabla 10.5). Pan y col. (1998) determinó que el ApC en las plantas se encuentra en mayor proporción esterificado a la lignina, la cual es un polímero formado por varios núcleos aromáticos del tipo fenilpropano de difícil degradación. Esto explicaría porque el ApC es tan difícil de extraer de la pared celular de las plantas por los extractos enzimáticos de los hongos filamentosos.

Los extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. a las 8 h de extracción extrajeron alrededor del 7% del ACI y 6% del ApC esterificados a la pared celular de la PC, este resultado fue mayor a lo extraído por el extracto enzimático de *A. tamaritii*. El extracto enzimático de *A. tamaritii* a las 8 h de reacción extrajo la mayor cantidad de AC (20.1%) y AF (59.3%) esterificado a la pared celular de la PC (Tabla 10.5).

Los extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. fueron buenos candidatos para ser usados en la extracción enzimática del ACI. Mientras que el extracto enzimático de *A. tamaritii* fue buen candidato para ser usado en la extracción de AC y AF (Tabla 10.5).

Las diferentes capacidades que mostraron los extractos enzimáticos para extraer el ACI y AH pueden deberse a que se producen diferentes tipos de enzimas durante la FMS que le confieren diferentes actividades a los extractos enzimáticos. Crepin y col. (2004) clasificó las FAE en 4 tipos, dependiendo su capacidad para liberar AF, AC, ácido sinápico y ApC. En futuros estudios será importante determinar a partir de purificaciones de proteínas y geles SDS el tipo de FAE que se está produciendo en los extractos enzimáticos de las 4 cepas ensayadas.

**Tabla 10.5.** Extracción enzimática del ACI y los AH esterificados a la pared celular de la PC

Extractos enzimáticos		ACI (mg/kg)	AC (mg/kg)	AF (mg/kg)	ApC (mg/kg)
<i>A. tamaritii</i>	6 h	97.8 ± 5.3 (4.1)	327.8 ± 2.3 (17.5)	32.6 ± 2.4 (39.3)	Trazas
	8 h	101.3 ± 4.7 (4.2)	375.6 ± 2.5 (20.1)	49.2 ± 2.6 (59.3)	Trazas
<i>R. pusillus</i>	6 h	331 ± 5.7 (13.9)	19.2 ± 2.4 (1)	3.2 ± 2.4 (3.8)	5.2 ± 1.3 (6.6)
	8 h	398.4 ± 5.3 (16.7)	21.3 ± 2.8 (1.1)	3.8 ± 2.2 (4.6)	5.6 ± 1.5 (7.1)
<i>Trametes</i> sp.	6 h	330.8 ± 4.6 (13.9)	29.4 ± 2.2 (1.6)	Trazas	4.9 ± 1.6 (6.2)
	8 h	398.6 ± 4.1 (16.7)	33.6 ± 3.7 (1.8)	Trazas	5.4 ± 1.4 (6.9)
<i>R. pusillus</i> y <i>A. tamaritii</i>	6 h	483.0 ± 3.5 (20.3)	564.1 ± 2.2 (30.1)	50.4 ± 3.5 (60.7)	4.8 ± 1.2 (6.1)
	8 h	565.1 ± 3.2 (23.7)	671.3 ± 2.5 (35.8)	55.6 ± 3.1 (67)	5.1 ± 0.9 (6.5)
<i>R. pusillus</i> y <i>Trametes</i> sp.	6 h	905.3 ± 4.2 (38)	56.7 ± 2.7 (3)	2.9 ± 1.1 (3.5)	11.2 ± 2.3 (14.2)
	8 h	1018.8 ± 3.9 (42.7)	63.5 ± 2.3 (3.4)	3.2 ± 1.9 (3.9)	11.9 ± 2.1 (15.1)
<i>A. tamaritii</i> y <i>Trametes</i> sp.	6 h	318.6 ± 3.2 (13.4)	440.6 ± 1.5 (23.5)	50.1 ± 2.8 (60.4)	5.1 ± 1.5 (6.5)
	8 h	377.2 ± 3.5 (15.8)	518.2 ± 2.0 (27.7)	52.3 ± 2.8 (63)	5.3 ± 1.1 (6.7)
<i>R. pusillus</i> , <i>A. tamaritii</i> y <i>Trametes</i> sp.	6 h	860.3 ± 4.5 (36.1)	618.5 ± 2.8 (33)	49.7 ± 3.1 (59.9)	10.7 ± 1.4 (13.6)
	8 h	965.9 ± 3.9 (40.5)	701.3 ± 3.1 (37.4)	51.6 ± 2.2 (62.2)	11.1 ± 1.6 (14.1)
Pectinasa comercial y <i>R. pusillus</i> (Torres-Mancera y col., 2011)	6 h	1296.2 ± 3.3 (54.4)	44 ± 3.2 (2.3)	16.4 ± 3.6 (19.8)	5.7 ± 1.2 (7.2)

Los ensayos se realizaron por triplicado. Los valores entre paréntesis están expresados en %.

El porcentaje de extracción esta en base a la cantidad de ACI y AH esterificados cuantificados (Tabla 10.4).

La extracción del ACI por los extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. a las 6 h (Tabla 10.5) fueron menores a los obtenidos en el trabajo previo (Torres-Mancera y col., 2011). Mientras que los rendimientos de extracción del AC y AF al usar el extracto

enzimático de *A. tamaritii* (Tabla 10.5) fueron mayores que la mezcla de pectinasa y el extracto enzimático de *R. pusillus* utilizado en el trabajo previo (Torres-Mancera y col., 2011). En el caso del rendimiento de extracción del ApC no hubo diferencias significativas ( $\alpha < 0.001$ ) entre los rendimientos de extracción con las cepas utilizadas.

En la Tabla 10.5 se presentan los resultados de extracción enzimática usando la combinación de dos y tres extractos enzimáticos producidos por FMS. Para el caso de la combinación de dos extractos enzimáticos tenemos que la mezcla de los extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. extraen 42.8% del ACI a las 8 h de reacción esto fue 3.1 veces mayor al extraído por los extractos de la mismas cepas de forma individual a las 8 h de reacción. Es claro el efecto sinérgico, la cantidad extraída al combinar dos extractos es superior a la suma de las cantidades extraídas por los extractos separados. Inclusive mayor que usar los 3 extractos producidos por FMS.

La mezcla de los extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *A. tamaritii* extrajeron 35.8% del AC esterificado a la pared celular de la PC esto fue 31.5 y 1.8 veces mayor al valor obtenido por los extractos de las mismas cepas de manera individual a las 8 h de reacción.

No se observaron diferencias significativas entre extraer el AF (67%) únicamente con el extracto de *A. tamaritii* en comparación con el uso de la combinación de dos extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *A. tamaritii* y *A. tamaritii* y *Trametes* sp. Este último resultado es similar al obtenido por Benoit y col. (2006) donde obtuvieron una eficiencia de extracción del 68% de AF al combinar la actividad de la FAE tipo A de *A. niger* con la actividad de la xilanasa.

La combinación de dos extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. extrajo 2.2 veces más ApC que la extracción enzimática realizada con los extractos individuales de cada una de las cepas antes mencionadas. La extracción enzimática del ACI a las 8 h usando la combinación de los extractos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. fue 5% mayor que la obtenida al combinar los 3 extractos enzimáticos. Con respecto a la extracción de AC a las 8 h, la combinación de 2 extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *A. tamaritii* extrajo 10% más AC que la combinación de 3 extractos enzimáticos.

No se observaron diferencias significativas entre extraer el AF con la combinación de dos extractos enzimáticos de *R. pusillus*-*A. tamarii* y *A. tamarii*-*Trametes* sp. y la combinación de los 3 extractos enzimáticos de *R. pusillus*, *A. tamarii* y *Trametes* sp. La extracción del ApC no presentó diferencias significativas entre ser extraído con la combinación de dos extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. y la combinación de los tres extractos enzimáticos de *R. pusillus*, *A. tamarii* y *Trametes* sp.

Un efecto sinérgico se observó en la extracción del ACI y AH al combinar dos o tres extractos enzimáticos, los rendimientos de extracción fueron mayores que la suma aritmética de la cantidad extraída por los extractos individuales. Este efecto sinérgico se ha observado en las cepas de *Trichoderma reesei* LM-UC4 y *Aspergillus phoenicis* QM 329, lo que resultó en un incremento en la producción de celulasas, endo-gluconasa,  $\beta$ -glucosidasas y xilanasas (2600 – 2800 U/g de materia húmeda) (Gutiérrez-Corres y Tengerdy, 1997). Esto es similar a los resultados encontrados. También se ha observado en la extracción enzimática de pectinas en donde altos rendimientos de extracción son obtenidos al combinar las enzimas pectinliasas con las *endo*-glucanasas (Renard y col., 1991).

La extracción enzimática del ACI en nuestro trabajo previo (Torres-Mancera y col., 2011) fue de 54.4% usando una mezcla de extractos enzimáticos de pectinasa comercial con un extracto enzimático producido por *R. pusillus*. Esto fue 1.3 veces mayor al obtenido al usar una mezcla de dos extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. La mayor eficiencia de extracción puede explicarse debido a la presencia de enzimas despolimerizantes como la pectinasa que degradan la pectina de la pared celular de la PC facilitando la actividad de las enzimas estererasas que hidrolizan el enlace éster entre el ACI y los monosacáridos de la pectina.

Tomando en cuenta los resultados anteriores obtenidos al emplear dos y tres extractos enzimáticos, que permitieron extraer la mayor cantidad de ACI, fueron adicionados de un extracto de pectinasa comercial como se realizó en un trabajo previo (Torres-Mancera y col., 2011). Las condiciones de reacción fueron 40°C, 100 rpm por 6 h

de reacción. El objetivo fue observar el efecto de la pectinasa comercial sobre la extracción del ACI covalentemente unido a la pared celular de la PC (Tabla 10.6).

En la Tabla 10.6 se observa que la extracción enzimática del ACI por la combinación de 2 y 3 extractos enzimáticos crudos más la pectinasa comercial no tuvo una diferencia significativa ( $\alpha < 0.001$ ), con ambos extractos se extrajo cerca del 68% del ACI covalentemente unido a la pared celular de la PC. El agregar la pectinasa comercial a la combinación de extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. mejoró la extracción del ACI 1.9 veces más que sin agregar la pectinasa comercial.

**Tabla 10.6.** Extracción enzimática del ACI y los AH utilizando mezclas de extractos enzimáticos y pectinasa comercial

Extractos enzimáticos	ACI (mg/kg)	AC (mg/kg)	AF (mg/kg)	ApC (mg/kg)
Pectinasa comercial, <i>R. pusillus</i> y <i>Trametes</i> sp.	1635.2 ± 5.2 (68.6)	101.3 ± 3.7 (5.4)	19.5 ± 2.8 (23.5)	10.6 ± 1.9 (13.5)
Pectinasa comercial, <i>R. pusillus</i> , <i>A. tamaritii</i> y <i>Trametes</i> sp.	1627.5 ± 5.3 (68.3)	715.5 ± 3.7 (38.2)	75.8 ± 2.1 (91.3)	11.1 ± 2.1 (14.1)

Los ensayos se realizaron por triplicado. Los valores entre paréntesis están expresados en %. El porcentaje de extracción esta en base a la cantidad de ACI y AH esterificados cuantificados (Tabla 10.5).

La extracción enzimática del AC y AF fue 1.2 y 1.5 veces mayor usando la combinación de 3 extractos enzimáticos crudos con la pectinasa comercial que sin agregar la pectinasa comercial a la combinación de 3 extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. (Tabla 10.6). La combinación de los extractos enzimáticos crudos mas la pectinasa comercial extrajo cerca del 91% del AF. La extracción enzimática del ApC no presentó diferencia significativa al ser extraído con la combinación de los 3 extractos crudos con y sin la pectinasa comercial.

La extracción enzimática del ACI, AC, AF y ApC fue mayor utilizando la combinación de los 3 extractos enzimáticos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. junto con la pectinasa comercial que la reportada en un previo trabajo (Torres-Mancera y col., 2011) donde se utilizó una mezcla de pectinasa comercial con un extracto crudo producido

por *R. pusillus*. Por lo que existe un efecto positivo en la extracción del ACI al incorporar enzimas despolimerizantes como la pectinasa comercial.

Esto muestra el potencial de usar extractos enzimáticos crudos para la obtención de compuestos con alto valor agregado como es el caso del ACI. Es así que para tener altos rendimientos de extracción del ACI es necesaria la presencia de enzimas despolimerizantes que degraden la pared celular de la PC y permitan extraer el ACI que se encuentra covalentemente unido a la pared celular de la PC.

Con los resultados antes mostrados se observa que las 3 cepas de hongos filamentosos fueron capaces de crecer en PC y producir enzimas pectinolíticas. *A. tamaritii* y *Trametes* sp. presentaron la mayor ACIE responsable de la hidrólisis del ACI, en comparación con *R. pusillus*. Por otro lado, el extracto enzimático de *A. tamaritii* extrajo sólo el 4% del ACI esterificado a la PC. Mientras que los extractos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. extrajeron cerca del 17% del ACI.

*R. pusillus* y *Trametes* sp. son cepas que podrían ser seleccionada debido a que tienen la capacidad de extraer el ACI. Sin embargo, *Trametes* sp. presenta una alta actividad CIE lo que podría producir pérdidas durante la extracción del ACI por la hidrólisis del mismo. A continuación se muestran los estudios de transformación a partir de medir la concentración de ACI y AH en la PCF por cada una de las cepas en las fermentaciones en matraces y en columnas.

### **10.2.3 Evaluación de la cantidad de ácido clorogénico y ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café durante la fermentación en matraces y en columnas**

Durante la fermentación en matraces y en columnas de *A. tamaritii*, *R. pusillus* y *Trametes* sp. no sólo se midieron las actividades enzimáticas de la pectinasa, FAE y CIE si no también se midió la evaluación de las concentraciones del ACI y AH en la PC durante el cultivo.

En la Tabla 10.7 se presenta la concentración de ACI y AH en la PC sin fermentar y PCF por *A. tamaritii* (28 h), *R. pusillus* (49 h) y *Trametes* sp. (58 h) cuando se alcanzó la

máxima actividad enzimática de las enzimas FAE y CIE en la fermentación en matraces con PC sin medio de cultivo.

Se observó que 97%, 94%, 77% y 73% del ApC, AC, ACl y AF respectivamente se encuentran covalentemente unidos a la pared celular de la PC, por lo que la concentración de ACl y AH libres es mínima. El contenido total de ACl y AH coincidió con lo reportado por otros autores (Benoit y col., 2006; Labat y col., 2000; Roussos y col., 1995).

Los cultivos de *A. niger* (CH4) y *A. tamarii* metabolizaron gran parte del ACl, 48% y 56%; de AC, 62% y 64%, y de AF, 61% y 83%, respectivamente (Tabla 10.7). Lo que demuestra su capacidad para liberar y transformar el ACl y los AH de la pared celular de la PC. En todos los casos la PCF presentó menor cantidad de ACl y AH libres respecto a los encontrados en la PC sin fermentar, lo que nos indica que durante el desarrollo de la fermentación se van produciendo enzimas que liberan el ACl y los AH de la pared celular de la PC y además se producen enzimas capaces de transformar los AH.

Los cultivos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. presentaron un 14% y 16% más ACl libre con respecto a la PC sin fermentar, transformando 8.7% y 19% del ACl, respectivamente. *Trametes* sp. transformó más ACl que *R. pusillus*. Por su parte *A. tamarii* produce enzimas que transforman más el ACl y los AH que *R. pusillus* y *Trametes* sp. La cantidad de ApC en la PCF de las tres cepas fue similar a la cantidad inicial de ApC en la PC sin fermentar ( $\alpha < 0.01$ ), lo que sugiere que este compuesto está poco disponible para ser liberado enzimáticamente por estos microorganismos.

Las tres cepas produjeron enzimas que durante la FMS permitieron liberar el ACl y AH de la pared celular de la PC. Cabe destacar que *R. pusillus* fue capaz de extraer el ACl y además, transformó una pequeña fracción del ACl provocando que se acumulara en el medio en comparación con *A. tamarii* y *Trametes* sp.

**Tabla 10.7.** Concentración de ACl y AH en la PC y PCF en la fermentación en matraces

			Cantidad de ACl y AH (mg/kg de PC)		
			Libres	Esterificados	Totales
ACI	PC	Sin inóculo	710.7 ± 3.5	2187.3 ± 3.2	2898.0 ± 4.3
		<i>A. tamarii</i>	38.8 ± 1.7	1250.2 ± 2.3	1289.0 ± 2.5
	PCF	<i>R. pusillus</i>	807.2 ± 2.5	1838.4 ± 2.5	2645.6 ± 2.7
		<i>Trametes sp.</i>	824.4 ± 2.5	1520.3 ± 2.3	2344.7 ± 2.6
AC	PC	Sin inóculo	103.5 ± 3.4	1879.7 ± 4.3	1983.2 ± 4.7
		<i>A. tamarii</i>	4.2 ± 1.1	715.1 ± 1.8	719.3 ± 1.9
	PCF	<i>R. pusillus</i>	95.1 ± 2.1	1591.7 ± 2.3	1686.7 ± 2.5
		<i>Trametes sp.</i>	89.3 ± 1.8	1576.2 ± 2.1	1665.5 ± 2.3
AF	PC	Sin inóculo	31.4 ± 2.2	80.1 ± 4.6	111.5 ± 5.6
		<i>A. tamarii</i>	11.2 ± 1.2	8.1 ± 1.1	19.4 ± 1.5
	PCF	<i>R. pusillus</i>	20.2 ± 1.7	54.3 ± 2.5	74.5 ± 2.5
		<i>Trametes sp.</i>	22.5 ± 1.9	67.0 ± 2.6	89.5 ± 2.7
ApC	PC	Sin inóculo	Trazas	80.5 ± 2.3	80.5 ± 2.3
		<i>A. tamarii</i>	Trazas	79.8 ± 2.5	79.8 ± 2.5
	PCF	<i>R. pusillus</i>	2.4 ± 0.9	77.1 ± 2.1	79.5 ± 2.4
		<i>Trametes sp.</i>	0.5 ± 0.2	79.8 ± 2.2	79.8 ± 2.2

Trazas: No cuantificables por HPLC.

A continuación se muestran en la Tabla 10.8 la composición de ACl y AH en la PCF que presentó medio de cultivo diluido al 50% de Asther y col. (2002) en la fermentación en columnas para las tres cepas ensayadas.

Para las tres cepas ensayadas se observó un aumento de entre 20% y 40% en la transformación del ACl y los AH con respecto a la fermentación en matraces donde no se utilizó medio de cultivo. *A. tamarii* metabolizó 68% del ACl presente en la PC. Por su parte la PCF por *R. pusillus* y *Trametes sp.* presentó un contenido mayor (23% y 48%) de ACl libre que la PC sin fermentar. Asther y col. (2005) demuestran que extractos enzimáticos de cepas de *Aspergillus* hidrolizaron entre un 86% y 100% del ACl presente en residuos de manzana y PC por la presencia de la enzima CIE. Por lo que es probable que durante la fermentación se esté produciendo la enzima CIE responsable de la hidrólisis del ACl.

**Tabla 10.8.** Composición de ACI y AH en la PC y PCF en la fermentación en columnas

			Cantidad de ACI y AH (mg/kg de PC)		
			Libres	Esterificados	Totales
ACI	PC	Sin inóculo	710.7 ± 3.5	2187.3 ± 3.2	2898.0 ± 4.3
		<i>A. tamaritii</i>	75.4 ± 2.2	844.2 ± 4.8	919.6 ± 4.5
	PCF	<i>R. pusillus</i>	872.9 ± 4.8	1512.3 ± 5.2	2385.3 ± 5.3
		<i>Trametes sp.</i>	1052.8 ± 5.4	814.2 ± 3.7	1867.0 ± 4.7
AC	PC	Sin inóculo	103.5 ± 3.4	1879.7 ± 4.3	1983.2 ± 4.7
		<i>A. tamaritii</i>	7.8 ± 1.5	51.7 ± 1.7	59.5 ± 2.1
	PCF	<i>R. pusillus</i>	43.9 ± 3.7	114.4 ± 4.1	158.3 ± 4.8
		<i>Trametes sp.</i>	37.3 ± 2.8	65.3 ± 3.3	102.5 ± 3.7
AF	PC	Sin inóculo	31.4 ± 2.2	80.1 ± 4.6	111.5 ± 5.6
		<i>A. tamaritii</i>	Trazas	3.9 ± 3.2	3.9 ± 3.2
	PCF	<i>R. pusillus</i>	Trazas	17.2 ± 3.5	17.2 ± 3.5
		<i>Trametes sp.</i>	Trazas	9.4 ± 3.4	9.4 ± 3.4
ApC	PC	Sin inóculo	Trazas	80.5 ± 2.3	80.5 ± 2.3
		<i>A. tamaritii</i>	Trazas	79.7 ± 2.3	79.7 ± 2.3
	PCF	<i>R. pusillus</i>	4.3 ± 0.9	72.9 ± 1.1	77.2 ± 2.3
		<i>Trametes sp.</i>	1.0 ± 0.4	79.5 ± 2.1	79.5 ± 2.1

Trazas: No cuantificables por HPLC.

El AC y el AF fueron transformados en más de un 90% por las 4 cepas. Los cultivos de *Trametes sp.* y *R. pusillus* liberaron solo 1.2% y 5.3% respectivamente de ApC, sin embargo no se observaron diferencias significativas con respecto a la cantidad de ApC liberado por ambas cepas en la fermentación en matraces de la PC sin medio de cultivo. Fue evidente que al añadir el medio de cultivo para favorecer la actividad de la FAE se observó mayor transformación del ACI y los AH. Esto indica que el medio de Asther y col. (2002) además de promover la actividad FAE también promueve la ACIE que es la responsable de hidrolizar el ACI a AC y AQ provocando pérdidas en la extracción del ACI. *R. pusillus* y *Trametes sp.* son las cepas con las que probablemente se pueda obtener un extracto enzimático que pueda extraer el ACI de la PC pero *Trametes sp.* hidroliza más ACI que *R. pusillus*.

Las muestras de la PCF de las fermentaciones en matraces y en columnas analizadas por HPLC mostraron la presencia de dos picos cuyas áreas aumentaron con respecto a la PC sin fermentar. Uno de los picos presentó un espectro de absorción característico con máximos a los 255 nm y 295 nm, lo que correspondió al ácido protocatecoico (AP). El otro pico presentó un espectro de absorción característico con un máximo a los 260 nm. Este compuesto no pudo ser identificado. Por lo que es posible que la disminución de la concentración de ACI y AH se deba a que estos compuestos están siendo transformados en otros compuestos más fácilmente metabolizables por las tres cepas de hongos filamentosos. Este aspecto será interesante estudiarlo en estudios posteriores.

Clifford (1999) demostró que el ACI se hidroliza de manera equimolar a AC y AQ. Smith y col. (2003) mencionaron que el AC puede ser biotransformado de manera equimolar a AP por *Acinetobacter* sp. ADP1 mediante una descarboxilación. Baqueiro-Peña y col. (2010); Seshime y col. (2005); Ward y col. (2010) reportaron la biotransformación de los AH por cepas de *Aspergillus* a otros compuestos tal es el caso del AF que puede ser transformado a ácido vainillínico y vainillina y el ApC que puede ser transformado a ácido *p*-hidroxibenzóico. Por lo que es posible que durante los cultivos de las 3 cepas el ACI y los AH se biotrasformaron a otros compuestos.

Aunque la cepa de *A. tamaritii* presentó una buena actividad pectinasa actividad (14.9 U/g MS) y FAE (3.2 y 20.6 U/g MS) en las fermentaciones en matraces y en columnas, el extracto enzimático de esta cepa extrajo la menor cantidad de ACI (4%) y además hidrolizó más del 50% del ACI presente en la PC. A continuación se presentan las conclusiones de la selección de las cepas.

#### **10.2.4 Conclusiones de la selección de las sepas**

Las 3 cepas pre-seleccionadas fueron capaces de crecer en PC usada como soporte/sustrato. Las enzimas FAE y CIE producidas en la fermentación en matraces presentaron perfiles de actividad enzimática similares para *A. tamaritii*, *R. pusillus* y *Trametes* sp. Por lo que es probable que se tratara de la misma enzima. Las actividades enzimáticas de ambas enzimas aumentaron en la fermentación en columnas al utilizar el medio de Asther y col. (2002) al 50%. Esto ocasionó un incremento entre el 20 y 40% de la

transformación del ACI, AC y AF en la PCF. Sin embargo, los resultados obtenidos no nos permitieron determinar si FAE y CIE son la misma enzima.

Por su parte, los extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. extrajeron aproximadamente 17% del ACI esterificado a la pared celular de la PC. *Trametes* sp. presentó la más alta actividad CIE (0.49 U/g MS) además hidrolizó 19% y 36% del ACI presente en la PC en las fermentaciones en matraces y en columnas. *Trametes* sp. hidrolizó 2.1 y 2 veces más ACI presente en la PC en las fermentaciones en matraces y en columnas que *R. pusillus* (9%).

Por lo tanto, se decidió seleccionar únicamente a *R. pusillus* ya que fue la cepa cuyo extracto enzimático extrajo la mayor cantidad de ACI sin hidrolizarlo con respecto a las 3 cepas ensayadas.

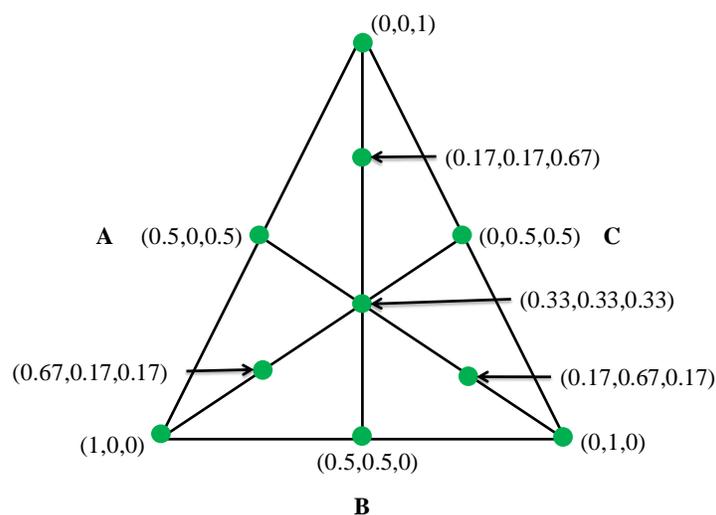
Además se observó un aumento en el rendimiento de extracción del ACI al mezclar los extractos enzimáticos crudos de las 3 cepas pre-seleccionadas con la pectinasa comercial. Es así, que para tener altos rendimientos de extracción del ACI es necesaria la presencia de enzimas despolimerizantes que degraden la pared celular de la PC para extraer el ACI.

Después de seleccionar a *R. pusillus* para producir los extractos enzimáticos por FMS que extraer el ACI de la PC, primeramente se determinó mediante un diseño de mezclas el efecto de las actividades enzimáticas despolimerizantes (pectinolítica, xilanolítica, celulolítica) sobre la extracción del ACI presente en al PC. Lo cual se presenta en el siguiente capítulo.

Posteriormente se establecieron las condiciones óptimas de cultivo sólido de *R. pusillus* que promovieran la producción de enzimas despolimerizantes necesarias para extraer el ACI esterificado a la PC, evitando la producción de la CIE, enzima responsable de la hidrólisis del ACI. Finalmente se evaluó la eficiencia de extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC con el extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido por FMS en las condiciones optimizadas.

## 11 EFECTO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DESPOLIMERIZANTES USANDO SOLAMENTE ENZIMAS COMERCIALES SOBRE LA EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO

El diseño de mezclas es una herramienta de los diseños experimentales que se utilizó para determinar cuál era el efecto de las actividades enzimáticas despolimerizantes (pectinasa, xilanasa y celulasa) sobre la extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC. Los ensayos se realizaron con concentraciones de 0 U/g PC a 200 U/g PC de cada una de las enzimas (pectinasa, xilanasa y celulasa). El diseño de mezclas se construyó con el programa STATISTICA versión 14, se realizó un diseño simplex centroide con puntos adicionales en el interior como se muestra en la Figura 11.1.



**Figura 11.1.** Diseño simplex centroide con puntos adicionales en el interior. A: APec, B: AXil y C: ACel

Las variables de respuesta que se midieron fueron la concentración de ACI y AH extraídos por cada una de las mezclas ensayadas. En la Tabla 11.1 se muestran los resultados obtenidos de cada una de las mezclas de extractos enzimáticos ensayadas por triplicado.

**Tabla 11.1.** Extracción enzimática del ACI y AH en el diseño de mezclas

APec	AXil	ACel	ACI (mg/kg)	AC (mg/kg)	AF (mg/kg)	ApC (mg/kg)
1	0	0	1053.2 ± 17.5	319.6 ± 1.9	27.5 ± 0.2	1.0 ± 0.2
0	1	0	1116.6 ± 15.4	246.7 ± 12.4	24.3 ± 0.1	0.7 ± 0.1
0	0	1	243.5 ± 3.3	596.0 ± 16.8	24.6 ± 0.0	1.0 ± 0.1
0.5	0.5	0	1638.0 ± 20.5	80.5 ± 1.8	15.3 ± 0.5	0.5 ± 0.2
0.5	0	0.5	1107.5 ± 6.3	219.1 ± 5.4	23.4 ± 0.6	0.8 ± 0.1
0	0.5	0.5	1077.3 ± 15.52	40.6 ± 0.3	23.8 ± 0.4	0.4 ± 0.0
0.67	0.17	0.17	1170.0 ± 16.7	273.9 ± 10.2	11.8 ± 0.6	1.3 ± 0.1
0.17	0.67	0.17	1137.2 ± 2.11	244.5 ± 8.1	11.5 ± 0.4	0.3 ± 0.0
0.17	0.17	0.67	920.6 ± 1.35	271.3 ± 18.9	28.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1
0.33	0.33	0.33	1302.1 ± 0.3	325.8 ± 4.8	17.5 ± 0.0	1.2 ± 0.1
0	0	0	187.7 ± 0.3	32.8 ± 2.5	11.1 ± 3.3	0.0

Ensayos por triplicado; 0: 0 U de enzima; 1: 200 U de enzima

En la Tabla 11.1 se observa que el máximo rendimiento de extracción de ACI fue de 68.7%, con respecto al ACI esterificado determinado en la PC (Tabla 10.4). Este rendimiento se obtuvo al usar la mezcla de pectinasa (100 U/g) y xilanasas (100 U/g). La extracción enzimática del ACI con el extracto enzimático que presentó la mezcla de la enzima pectinasa y xilanasas es similar al obtenido en la sección 10 que fue del 68% de extracción de ACI al utilizar un extracto enzimático que presentó la mezcla de 3 extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaris* y *Trametes* sp. con el extracto de la pectinasa comercial.

Además, se midieron las concentraciones de los AH, se observa que el mayor rendimiento de extracción (31.8%) del AC se obtuvo cuando el extracto enzimático sólo tenía celulasa. En el caso de la extracción del AF el máximo rendimiento de extracción se obtuvo cuando los extractos enzimáticos presentaron sólo pectinasa (33.1%) y cuando presentaron una mezcla de las enzimas pectinasa/xilanasas/celulasa en una proporción 0.17/0.17/0.67 (33.8%). El mayor rendimiento de extracción (1.5%) del ApC esterificado se obtuvo cuando el extracto enzimático presentó una mezcla con concentraciones iguales de pectinasa/xilanasas/celulasa.

A continuación se muestra el análisis estadístico realizado para el diseño de mezclas que constó de 3 etapas:

- a) Verificar que al menos 2 de las mezclas probadas presentaron diferencias significativas.
- b) Determinar el modelo que mejor se ajustó al comportamiento de la variable respuesta.
- c) Determinar cuáles fueron las mejores condiciones que maximizaron la variable respuesta.

Se ensayaron 10 mezclas de extractos enzimáticos por triplicado (Tabla 11.1) de las enzimas pectinasa, xilanasa y celulasa. Las variables de respuesta en el diseño simplex centroide utilizado fueron las concentraciones de ACI y de AH liberados de la PC.

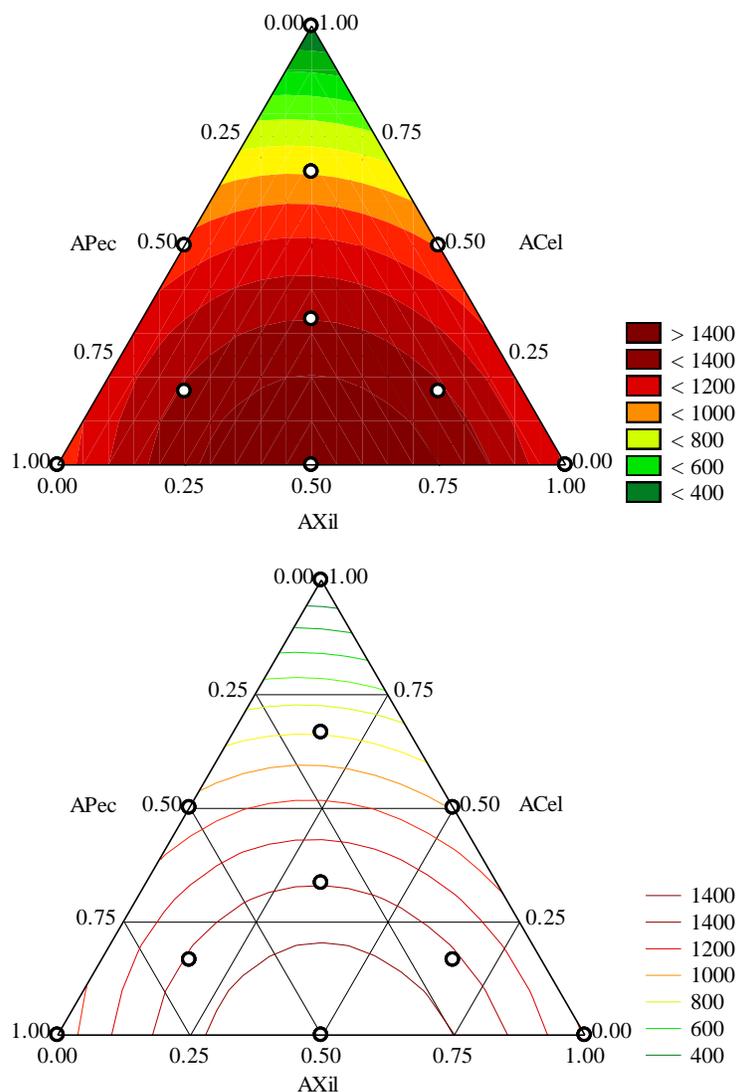
Primero se analizaron los resultados obtenidos con relación a la extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC. Se tiene que con una F de 91.6 y un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  se determinó que existían diferencias en 2 o más de las mezclas de los extractos enzimáticos ensayados en el diseño de mezclas por lo que se puede seguir con el análisis estadístico. El modelo que mejor se ajustó a la concentración de ACI liberado por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados fue el modelo cuadrático con una F de 29.8, un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  y una  $R^2$  de 0.912 del tipo:

$$Y = 1038.1A + 1089.5B + 284.9C + 1735.8AB + 1496.9AC + 1225.3BC \quad (1)$$

Donde: A: APec; B: AXil; C: ACel

Todos los coeficientes de regresión del modelo cuadrático con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  fueron diferentes de cero (Anexo 2). Además, los coeficientes de las APec, AXil y las mezclas de las tres actividades enzimáticas despolimerizantes nos muestran que tienen un efecto positivo importante sobre la extracción del ACI. La ACel presenta el menor de los efectos sobre la extracción del ACI en comparación con la APec y AXil.

En la Figura 11.2 se presenta la curva de nivel del diseño de mezclas simplex centroide para la extracción enzimática del ACI calculada con la Ec. 1.

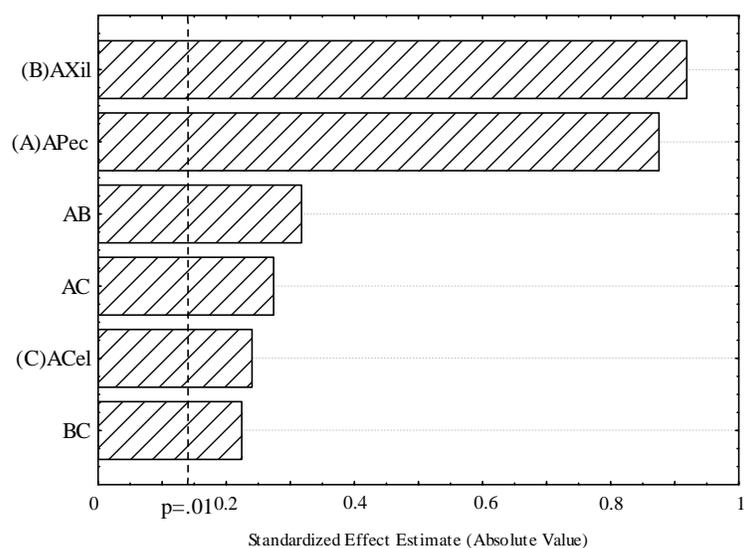


**Figura 11.2.** Curvas de nivel para la extracción enzimática del ACI con diferentes mezclas de la APec, AXil y ACel. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

La intensidad de la variable respuesta estuvo representada por los colores que fueron de verde a rojo, donde el color rojo representó el máximo valor de la variable respuesta. Se observa que conforme aumenta la presencia de la ACel y decrece la presencia tanto de la APec como de la AXil se afecta de manera negativa la extracción del ACI esterificado. La extracción de ACI esterificado incrementa conforme aumenta la presencia de la APec y AXil y disminuye la presencia de la ACel. Los intervalos donde se presenta la zona de máxima extracción de ACI esterificado para las 3 enzimas son:  $0.30 \leq AXil \leq 0.75$ ,  $0.25 \leq APec \leq 0.70$ ,  $0 \leq ACel \leq 0.20$ . Con la Ec. 1 se determinó que el punto donde la derivada de

hace cero que es donde se tendría la extracción máxima de ACI esterificado con las condiciones ensayadas sería donde el valor de la APec fuera de 0.47 y el de la AXil fuera de 0.53.

En la Figura 11.3 se presenta el diagrama de Pareto de los efectos de las enzimas pectinasa, xilanasa y celulasa sobre la extracción del ACI que está covalentemente unido a la pared celular de la PC.



**Figura 11.3.** Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de ACI

En la Figura 11.3 se observa que la presencia de la APec y AXil tienen un efecto importante en la extracción del ACI ( $p = 0.01$ ). Por lo tanto en la extracción del ACI es indispensable promover la presencia de la APec y AXil en los extractos enzimáticos crudos producidos por FMS. En la actualidad no existen reportes en donde se haya determinado como se encuentra el ACI unido a la pared celular de la PC. Con los resultados obtenidos es posible que gran parte del ACI se encuentre esterificado a los polisacáridos de pectina y xilano, por eso la APec y AXil fueron importantes para su extracción. Esto deberá ser corroborado.

En el caso de la extracción del AC, APc y AF esterificados a la pared celular de la PC tenemos que con una F de 816.7, 89.4 y 26.3, respectivamente y un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  se determinó que existían diferencias significativas entre 2 o más mezclas de los extractos enzimáticos ensayados en el diseño de mezclas.

Los modelos que mejor se ajustaron en donde todos los coeficientes  $\beta$  de los modelos con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  fueron diferentes de cero fueron los siguientes:

a) Para la extracción enzimática del AC el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el modelo cúbico, con una F de 116.4, un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  y una  $R^2$  de 0.997 (Anexo 2).

$$Y = 319.4A + 246.5B + 595.8C - 811.4AB - 995.6AC - 1523.8BC + 8169ABC - 1141.49AB(A-B) + 1303.7AC(A-C) \quad (2)$$

Donde: A: APec; B: AXil; C: ACel

Los coeficientes de regresión de las tres actividades enzimáticas despolimerizantes nos muestran que estas actividades tienen un efecto positivo en la extracción del AC. Se observa que la ACel tiene el efecto más importante en la extracción del AC. Por otro lado, las mezclas de dos actividades enzimáticas despolimerizantes tienen un efecto negativo. Mientras que la mezcla de las tres enzimas despolimerizantes tiene un efecto positivo sobre la extracción del AC.

b) Para la extracción enzimática del AF el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el modelo cúbico, con una F de 85.5, un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  y una  $R^2$  de 0.962 (Anexo 2).

$$Y = 27.3A + 24.1B + 24.4C - 43.4AB - 11.8AC - 92.9ABC + 79.6AB(A-B) - 170.1AC(A-C) \quad (3)$$

Donde: A: APec; B: AXil; C: ACel

El coeficiente de regresión de la APec nos muestra que tiene el efecto positivo más importante en comparación con los coeficientes de regresión de las AXil y ACel. Se

observa que el efecto de las mezclas de las APec-AXil, APec-ACel y APec-AXil-ACel tiene un efecto negativo en la extracción del AF.

c) Para la extracción enzimática del ApC el modelo que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el modelo cúbico, con una F de 45.2, un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  y una  $R^2$  de 0.918 (Anexo 2).

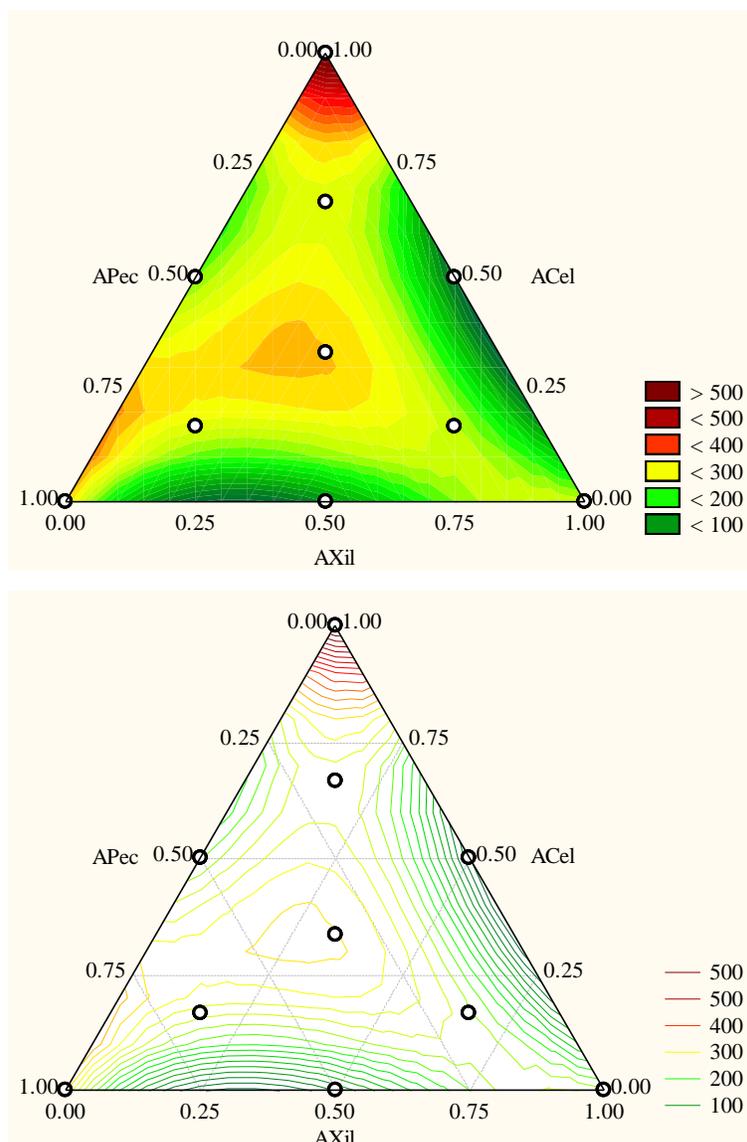
$$Y = 0.9A + 0.7B + 0.9C - 1.5AB - 0.9AC - 1.9BC + 15.6ABC + 3.7AB(A-B) + 6.5AC(A-C) \quad (4)$$

Donde: A: APec; B: AXil; C: ACel

Los coeficientes de regresión de la APec y ACel nos muestran que estas dos actividades tienen un efecto positivo importante en la extracción del ApC en comparación con la AXil. La mezcla de dos actividades enzimáticas despolimerizantes presenta un efecto negativo en la extracción del ApC, no así para la mezcla de las 3 actividades enzimáticas despolimerizantes, la cual presenta un efecto positivo.

En las Figuras 11.4, 11.5, 11.6, 11.7, 11.8 y 11.9 se presentan las curvas de nivel ajustadas y diagramas de Pareto del diseño simplex centroide para la extracción de AC, AF y ApC. Los círculos blancos en las figuras representan cada una de las mezclas ensayadas en el diseño. La intensidad de la variable respuesta está representada por colores que fueron de verde a rojo, donde el rojo representó la máxima intensidad.

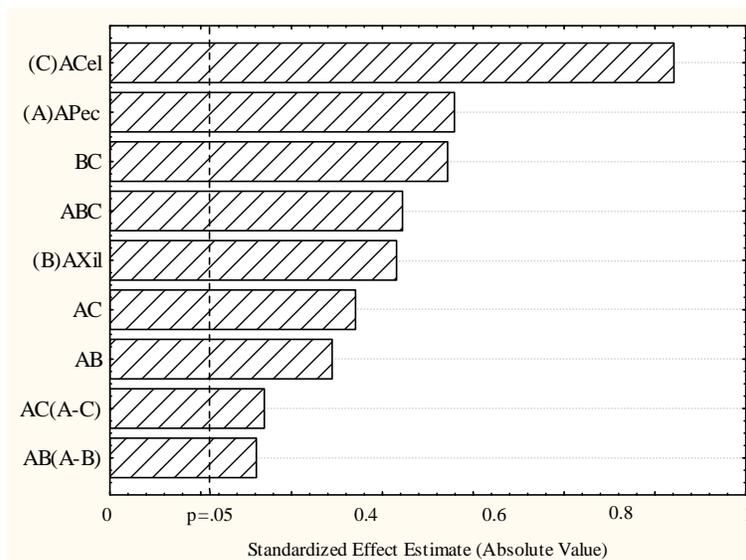
En la Figura 11.4 se observa que al incrementar la presencia de la ACel, se observa que afecta de manera positiva la extracción de AC. Por el contrario, aumentar la presencia de la APec y AXil y disminuir la presencia de ACel, afecta de manera negativa la extracción enzimática del AC esterificado a la pared celular de la PC. Los intervalos donde se presenta la zona de máxima extracción de AC esterificado para las 3 enzimas son:  $0 \leq AXil \leq 0.10$ ,  $0 \leq APec \leq 0.15$ ,  $0.8 \leq ACel \leq 1$ .



**Figura 11.4.** Curvas de nivel para la extracción enzimática del AC con diferentes mezclas de la APec, AXil y ACel. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

En la Figura 11.5 se presenta el diagrama de Pareto de los efectos de la APec, AXil y ACel sobre la extracción enzimática del AC esterificado. Se observa que la ACel tuvo un efecto importante en la extracción del AC ( $p = 0.05$ ) seguido de la presencia de la APec y la combinación de la mezcla de la ACel y AXil. Por lo tanto en la extracción del AC esterificado sería importante tener la presencia de la ACel en los extractos enzimáticos crudos producidos por FMS.

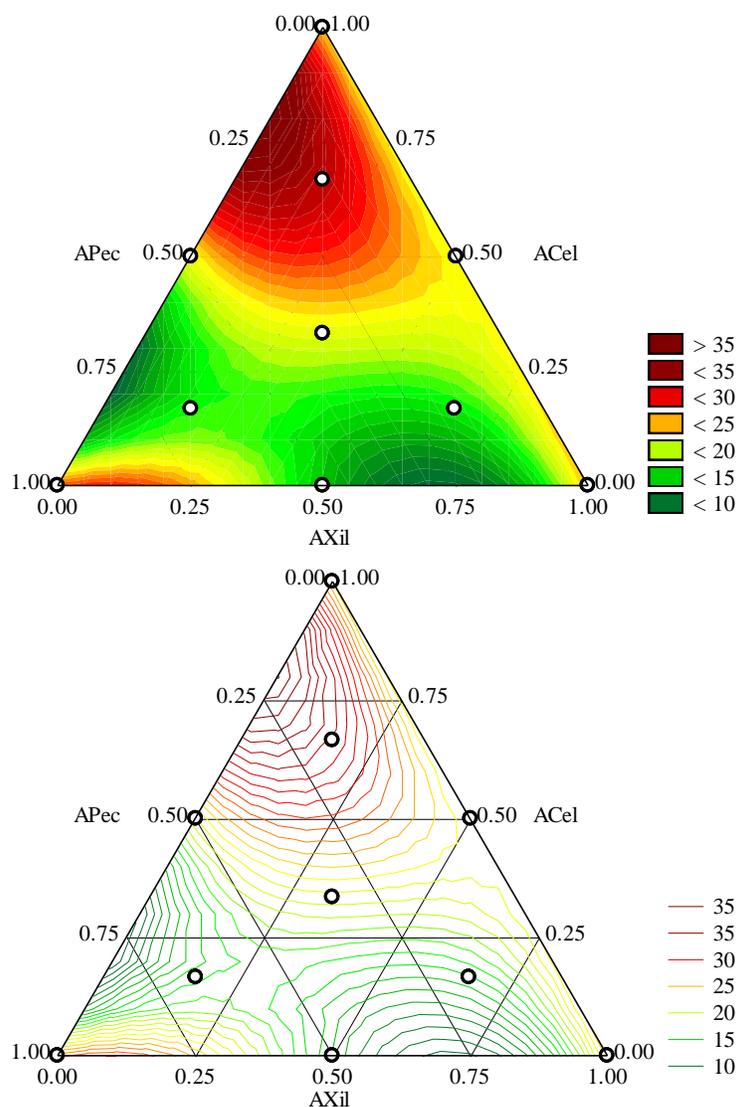
El AC esta covalentemente unido a los polisacáridos como: arabinoxilanos, xiloglucanos y pectinas (Clifford, 1999). Esto explicaría porque la presencia de la ACel tiene un efecto importante, seguido de la APec y AXil para extraer el AC presente en la PC.



**Figura 11.5.** Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de AC

En la Figura 11.6 se presenta la curva de nivel ajustada para la extracción enzimática del AF con los extractos enzimáticos ensayados.

Se observan dos zonas donde se podría tener la máxima extracción del AF esterificado. La extracción del AF esterificado se ve favorecida cuándo: 1) Aumenta la presencia de la ACel, aumenta la APec hasta un valor de 0.5 y aumenta la AXil hasta un valor de 0.3, 2) Disminuye la presencia de la AXil y ACel y aumenta la presencia de la APec. La presencia de las 3 enzimas resultó ser relevante para llevar a cabo la extracción del AF esterificado a la pared celular de la PC. Los intervalos donde se presentan las zonas de máxima extracción de AF esterificado para las 3 enzimas son: 1)  $0 \leq AXil \leq 0.25$ ,  $0 \leq APec \leq 0.40$ ,  $0.5 \leq ACel \leq 1$ , 2)  $0 \leq AXil \leq 0.25$ ,  $0.9 \leq APec \leq 1$ ,  $0 \leq ACel \leq 0.1$ .

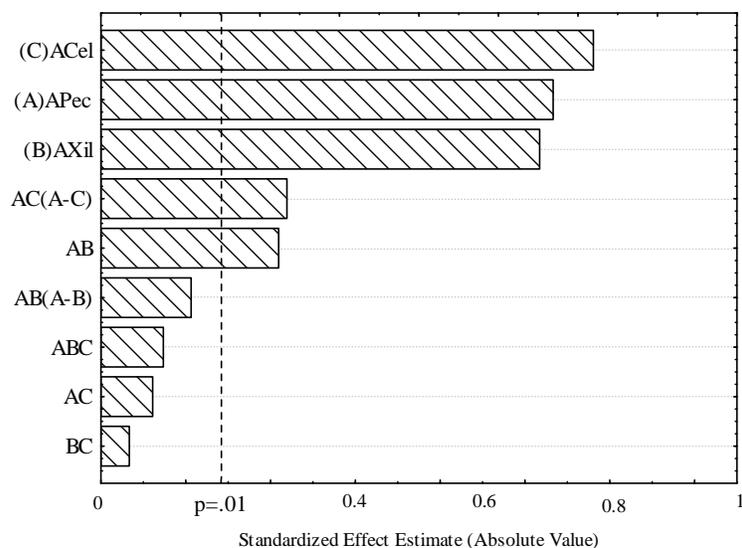


**Figura 11.6.** Curvas de nivel para la extracción enzimática del AF con diferentes mezclas de APec, AXil y ACel. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

En la Figura 11.7 se presenta el diagrama de Pareto de los efectos de las enzimas comerciales en la extracción enzimática del AF covalentemente unido a la pared celular de la PC. Se observa que hay un efecto individual importante en la extracción del AF por parte de la APec, AXil y ACel. Sin embargo, la mezcla de las enzimas no benefició significativamente ( $p = 0.01$ ) la liberación del AF esterificado a la pared celular de la PC.

El AF se encuentra unido covalentemente a los residuos de L-arabinosa en la posición O-2 y de D-galactosa en la posición O-6, por lo que efectivamente la presencia de

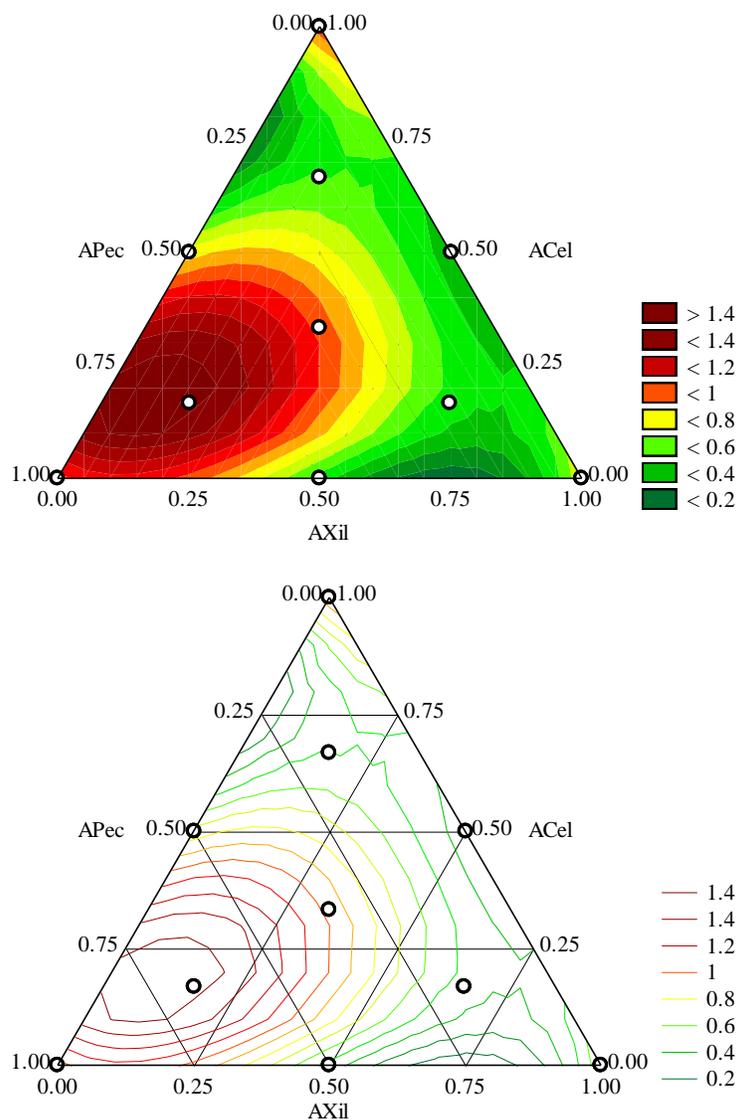
la APec es importante para degradar los oligosacáridos feruloilados presentes en la PC y llevar a cabo la extracción del AF (Ralet y col., 1994).



**Figura 11.7.** Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de AF

La Figura 11.8 muestra la curva de nivel para la extracción enzimática del ApC por las enzimas comerciales pectinasa, xilanasa y celulasa.

Se observa que conforme aumenta la presencia de la APec y aumenta la presencia de la AXil hasta un valor de 0.3 mientras disminuye la presencia de la ACel se ve afectada de manera positiva la extracción del ApC esterificado a la pared celular de la PC. Los intervalos donde se presenta la zona de máxima extracción de ApC esterificado para las 3 enzimas son:  $0 \leq AXil \leq 0.3$ ,  $0.6 \leq APec \leq 1$ ,  $0.1 \leq ACel \leq 0.4$ .

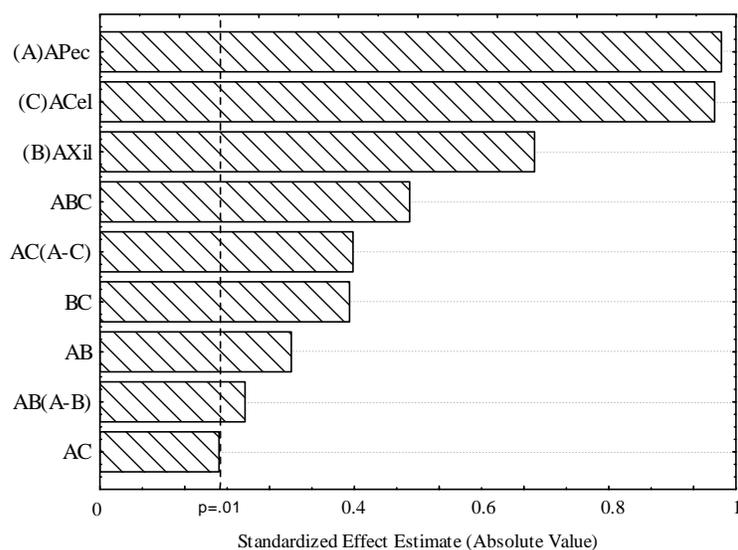


**Figura 11.8.** Curvas de nivel para la extracción enzimática del ApC con diferentes mezclas de APec, AXil y ACel. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

En la Figura 11.9 se presenta el diagrama de Pareto de los efectos de las enzimas comerciales pectinasa, xilanasas y celulasas sobre la extracción enzimática del ApC. Se observa con un nivel de significancia  $p = 0.01$  que la ACel y APec representaron el efecto más importante en la extracción enzimática del ApC. Seguido de la AXil y la mezcla de las 3 enzimas comerciales.

Pan y col. (1998) determinó que el ApC se encuentra en mayor proporción esterificado a la lignina, la cual es un polímero formado por varios núcleos aromáticos del

tipo fenilpropano. La lignina junto con la celulosa proporcionan la rigidez a la pared celular de las plantas. Por lo que la ACel es importante debido a que degrada la celulosa presente en la pared celular de la PC, provocando que enzimas que se encuentran en la pectinasa comercial puedan liberar el ApC. Sin embargo la lignina es de difícil degradación debido a que presenta gran resistencia tanto al ataque de sustancias químicas como a la acción de microorganismos (Martín, 1980). Esto explicaría porque el ApC es difícil de extraer de la pared celular de las plantas.



**Figura 11.9.** Diagrama de Pareto de los efectos de cada una de las enzimas ensayadas sobre la extracción de ApC

Los rendimientos de extracción del AC, AF y ApC por las enzimas comerciales no fueron mayores a los obtenidos en la sección 10 donde se utilizaron extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. producidos por FMS, donde se indujo la actividad de la FAE, lo cual era esperado, debido a que no todas las enzimas comerciales despolimerizantes presentan en su composición enzimas del tipo FAE que hidrolizan el enlace éster entre los AH y los monosacáridos de la pared celular de la PC.

Torres-Mancera y col. (2011) observaron que agregar pectinasa comercial al extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido por FMS usando PC como soporte favorece la extracción de ACI y AH presentes en la PC. Benoit y col. (2006) observaron que al utilizar una mezcla de FAE tipo A de *A. niger* se favorece la extracción del AF

(68%). En la sección 10 se observó que agregar pectinasa comercial a los extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. producidos por FMS usando PC se favorece la extracción del ACI y AH presentes en la PC. La presencia de las enzimas despolimerizantes es indispensable para poder obtener altos rendimientos de extracción del ACI y AH presentes en la PC ya que estos compuestos se encuentran esterificados en un 70% a los monosacáridos de la pectina presentes en la PC. A continuación se presentan las conclusiones del diseño de mezclas.

### 11.1 CONCLUSIONES DEL EFECTO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DEPOLIMERIZANTES SOBRE LA EXTRACCIÓN DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO

El diseño de mezclas simplex centroide mostró que la presencia de las enzimas pectinasa y xilanasas tuvieron un efecto positivo importante en la extracción del ACI. Los intervalos de concentraciones (U/g PC) donde se presentó la zona de máxima extracción de ácido clorogénico esterificado para las 3 enzimas fue:  $60 \leq AXil \leq 150$ ,  $50 \leq APec \leq 140$ ,  $0 \leq ACEl \leq 40$ .

El rendimiento de extracción del ACI obtenido con la mezcla de pectinasa/xilanasas 100/100 U por g de PC fue similar al rendimiento de extracción de ACI (68%) anteriormente obtenido usando una mezcla de 3 extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. con el extracto de la pectinasa comercial (10 U/g PC). Por lo que se decidió buscar promover estas dos actividades enzimáticas en el extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido por FMS.

Por otro lado, se determinó que los rendimientos de extracción del AC (31.8%), AF (33.1%) y ApC (1.7%) por parte de las enzimas comerciales no fueron mayores a los obtenidos al usar los extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus*, *A. tamaritii* y *Trametes* sp. Esto se debe principalmente a la presencia de la FAE que hidroliza el enlace éster entre los AH y los monosacáridos de la pared celular de la PC.

En el siguiente capítulo se muestran los resultados de establecer las condiciones óptimas de cultivo sólido de *R. pusillus* que promovieran la producción de enzimas despolimerizantes necesarias para extraer el ACI esterificado a la PC, evitando la

producción de la CIE, enzima responsable de la hidrólisis del ACI. Esto se realizó con ayuda del diseño experimental tipo Plackett-Burman y el diseño factorial central compuesto.

Finalmente se muestran los resultados de la eficiencia de extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC con el extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido por FMS en las condiciones optimizadas.

## **12 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO CAPAZ DE EXTRAER EL ACIDO CLOROGÉNICO SIN HIDROLIZARLO**

En este capítulo se muestra la optimización de las condiciones de cultivo para la extracción de extractos enzimáticos de *R. pusillus* producidos por FMS para llevar a cabo la extracción del ACI que se encuentra unido covalentemente a la pared celular de la PC.

Primeramente se mostrarán los resultados del diseño experimental tipo Plackett-Burman con el cual se determinaron los factores de las condiciones de cultivo que afectaron la APec, AXil, ACel y ACIE. Posteriormente se presentaran los resultados del diseño factorial central compuesto con el que se determinaron las condiciones óptimas de cultivo para la producción del extracto enzimático crudo que extraerá el ACI presente en la PC.

### **12.1 DISEÑO EXPERIMENTAL TIPO PLACKETT-BURMAN PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS**

Con el diseño experimental tipo Plackett-Burman se buscó determinar los factores de las condiciones de cultivo (fuente de carbono y nitrógeno, micro-nutrientes, temperatura, tamaño de partícula) que afectan la APec, AXil, ACel y ACIE. Principalmente se buscó promover la APec y AXil ya que en el diseño de mezclas se determinó que la extracción enzimática del ACI esterificado a la pared celular de la PC se ve mayormente afectada por la presencia de estas dos actividades enzimáticas. Además, se busca inhibir la presencia de la ACIE responsable de la hidrólisis del ACI en AC y AQ, ocasionando pérdidas en su extracción.

En este estudio se consideraron a las actividades de las enzimas pectinasa, xilanasa, celulasa y CIE como variables de respuesta durante la FMS de *R. pusillus*. Este conjunto de enzimas tuvo un efecto significativo ( $\alpha < 0.001$ ) en la extracción del ACI presente en la PC. Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el diseño de mezclas se consideró lo siguiente: a) La eficiencia de extracción del ACI aumenta al mejorar las actividades enzimáticas despolimerizantes de las enzimas pectinasa y xilanasa, b) Se debe evitar lo más posible la producción de la CIE que hidroliza el ACI porque ocasiona pérdidas en la

extracción enzimática del ACI y c) Al usar una mezcla de residuos agroindustriales como PC, GO y BC es posible promover la producción de enzimas con diferentes actividades enzimáticas que favorecerán la extracción del ACI covalentemente unido a la pared celular de la PC y favorecerá su acumulación en el medio de reacción.

La expresión de una actividad enzimática particular en los extractos enzimáticos producidos por FMS es afectada por diversos factores (Pandey, 2003). Con el propósito de determinar el efecto de diversos factores sobre la actividad enzimática se puede recurrir a diseños experimentales tipo Plackett-Burman en los cuales con un número reducido de experimentos es posible determinar el efecto de los factores que más influyen sobre la expresión de la actividad enzimática.

En el diseño experimental tipo Plackett-Burman se estudiaron factores como la fuente de carbono (sacarosa y maltosa), fuente de nitrógeno ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), solución de oligoelementos, temperatura y tamaño de partícula. La matriz del diseño se construyó con el programa STATISTICA versión 14. En la Figura 12.1 se observa las 8 corridas ensayadas. Los signos positivo y negativo representaron el nivel máximo y mínimo, respectivamente de cada factor estudiado.

	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	$x_6$	$x_7$
<b>M1</b>	-	-	-	+	+	+	-
<b>M2</b>	+	-	-	-	-	+	+
<b>M3</b>	-	+	-	-	+	-	+
<b>M4</b>	+	+	-	+	-	-	-
<b>M5</b>	-	-	+	+	-	-	+
<b>M6</b>	+	-	+	-	+	-	-
<b>M7</b>	-	+	+	-	-	+	-
<b>M8</b>	+	+	+	+	+	+	+

**Figura 12.1.** Diseño experimental tipo Plackett-Burman

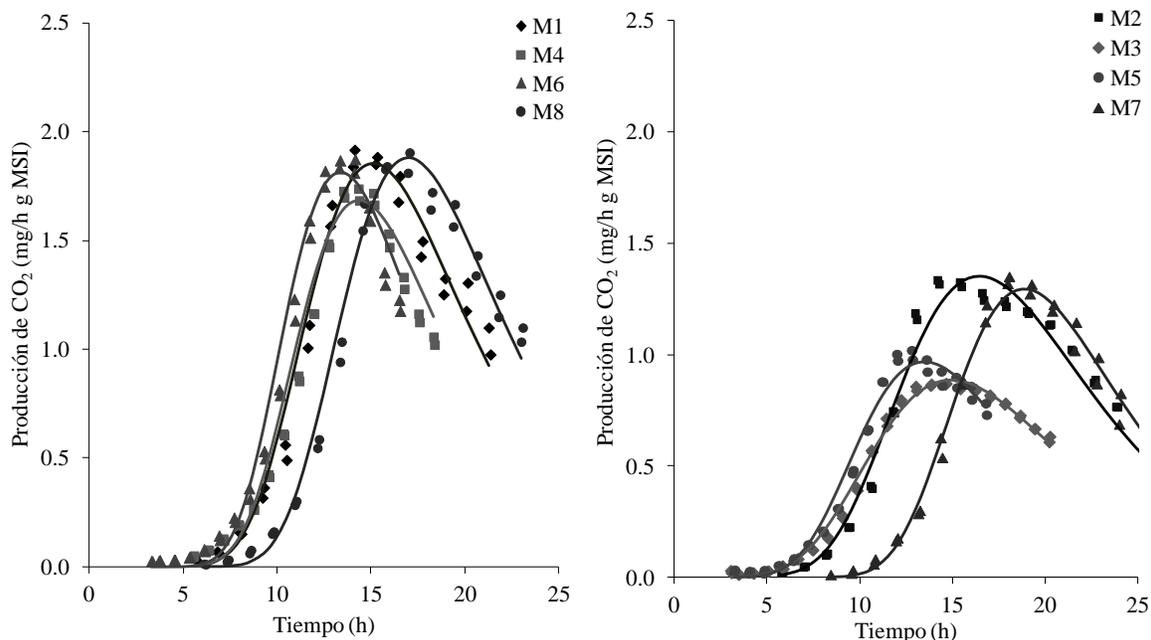
Las variables respuestas medidas en este diseño de experimentos fueron: la APec, AXil, ACel y ACIE.

En la Tabla 12.1 se presentan las condiciones de cultivo para cada uno de los ensayos realizado en el diseño tipo Plackett-Burman.

**Tabla 12.1.** Condiciones para cada uno de los ensayos del diseño tipo Plackett-Burman

	Factores						
	Concentración (100g SS)						
	Sacarosa (g)	Maltosa (g)	Soln. Oligo (ml)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g)	T (°C)	Tamaño de partícula
<b>M1</b>	1	1	0.1	2	2	40	Malla 12
<b>M2</b>	6	1	0.1	0.5	0.5	40	Malla 20
<b>M3</b>	1	6	0.1	0.5	2	30	Malla 20
<b>M4</b>	6	6	0.1	2	0.5	30	Malla 12
<b>M5</b>	1	1	1	2	0.5	30	Malla 20
<b>M6</b>	6	1	1	0.5	2	30	Malla 12
<b>M7</b>	1	6	1	0.5	0.5	40	Malla 12
<b>M8</b>	6	6	1	2	2	40	Malla 20

En la Figura 12.2 se muestra la producción de CO<sub>2</sub> de cada una de las condiciones ensayadas, la línea continua corresponde al modelo ajustado de Gompertz con una R<sup>2</sup> > 0.9 (Anexo 1). Se observa que las corridas M1, M4, M6 y M8 presentaron la mayor producción de CO<sub>2</sub>. Las corridas M8 y M1 se incubaron a una temperatura de 40°C, la producción de CO<sub>2</sub> fue de 1.88 y 1.85 mg CO<sub>2</sub>/h g MSI. Las corridas M6 y M4 se incubaron a 30°C, la producción de CO<sub>2</sub> fue de 1.81 y 1.68 mg CO<sub>2</sub>/h g MSI. La corrida M3 que se realizó a una temperatura de incubación de 30°C, tuvo la menor producción de CO<sub>2</sub>, 0.88 mg CO<sub>2</sub>/h g MSI. A partir de la cantidad de CO<sub>2</sub> producido y el modelo de Gompertz se estimó la actividad respiratoria ( $\mu_{CO_2}$ ) que fue una manera indirecta de conocer la tasa específica de crecimiento para cada condición ensayada.



**Figura 12.2.** Producción de CO<sub>2</sub> de las corridas ensayadas M1 - M8 del diseño experimental tipo Plackett-Burman

En la Tabla 12.2 se presentan los resultados de  $\mu_{\text{CO}_2}$ , pH y humedad medidos para cada una de las corridas.

**Tabla 12.2.** Actividad respiratoria estimada, humedad y pH medidos para cada una de las corridas ensayadas

	CO <sub>2</sub> max (mg/g MSI)	$\mu_{\text{CO}_2}$ (h <sup>-1</sup> )	Humedad (%)		pH	
			Inicial	Final	Inicial	Final
<b>M1</b>	21.2	0.24	59.64	58.92	6.06	5.68
<b>M2</b>	18.9	0.19	60.06	59.35	6.07	5.47
<b>M3</b>	12.4	0.19	60.21	57.66	5.95	4.82
<b>M4</b>	17.8	0.26	59.88	57.99	6.04	3.56
<b>M5</b>	11.2	0.23	59.85	58.83	5.98	4.38
<b>M6</b>	17.3	0.28	59.99	59.08	6.07	4.08
<b>M7</b>	15.5	0.23	59.93	59.47	6.07	5.27
<b>M8</b>	21.4	0.24	59.97	58.60	6.03	5.02

Ensayos por duplicado

En la Tabla 12.2 se observa que la corrida M1 y M8 presentaron la mayor producción de CO<sub>2</sub> y la corrida M5 presentó la menor producción de CO<sub>2</sub>. La corrida M6

tuvo la mayor  $\mu_{CO_2}$ . Mientras que la corrida M3 presentó la menor  $\mu_{CO_2}$ . Es así, que para algunas corridas cuando se presentó la mayor producción de  $CO_2$  también se presentó la mayor  $\mu_{CO_2}$ . La humedad inicial de todas las corridas M1 - M8 fue aproximadamente del 60%, ésta disminuyó entre una y dos unidades para todas corridas ensayadas. En relación al pH se observa que al inicio las corridas M1 - M8 presentan un pH cercano a 6. Al final de la fermentación se observa que el pH disminuye, esto se debió a que conforme se van consumiendo las fuentes de carbono presentes en el medio se van formando ácidos orgánicos, los cuales son los responsables de la disminución del pH en el medio de cultivo. Las sales de amonio utilizadas como fuente de nitrógeno también provocan una disminución en el pH durante el crecimiento microbiano. El crecimiento de los hongos filamentosos se ve afectado conforme disminuye el pH, teniendo que a un pH menor a 3 se favorece el crecimiento de las bacterias.

En la Tabla 12.3 se presentan las actividades enzimáticas medidas en cada una de las corridas ensayadas en el diseño experimental tipo Plackett-Burman. La corrida M8 mostró la mayor actividad APec, AXil y ACel lo cual coincidió con la mayor producción de  $CO_2$  (Figura 12.3) obtenida en comparación con las demás condiciones ensayadas. La actividad APec y AXil fueron menores a lo reportado por Bai y col. (1680 U/ g MS) para un extracto con APec de *A. niger* producido por FMS en remolacha azucarera y Maciel y col. (190 U/g MS) para un extracto con AXil *A. niger* producido por FMS en una mezcla de bagazo de caña y harina de soya respectivamente. Mientras que la menor actividad APec, AXil y ACel coincidió con la menor producción de  $CO_2$  observado en la corrida M3 (Figura 12.4). Esto nos indica que el crecimiento de la cepa pudo estar relacionado con la producción de las enzimas despolimerizantes. La ACIE fue menor en las corridas M4 (Anexo 3) y M6 (Figura 12.5) donde se incubó a 30°C. Mientras que en las corridas M2 y M7 donde se incubó a 40°C fueron las que presentaron la mayor ACIE.

**Tabla 12.3.** Actividades enzimáticas medidas en las corridas ensayadas en el diseño experimental tipo Plackett-Burman

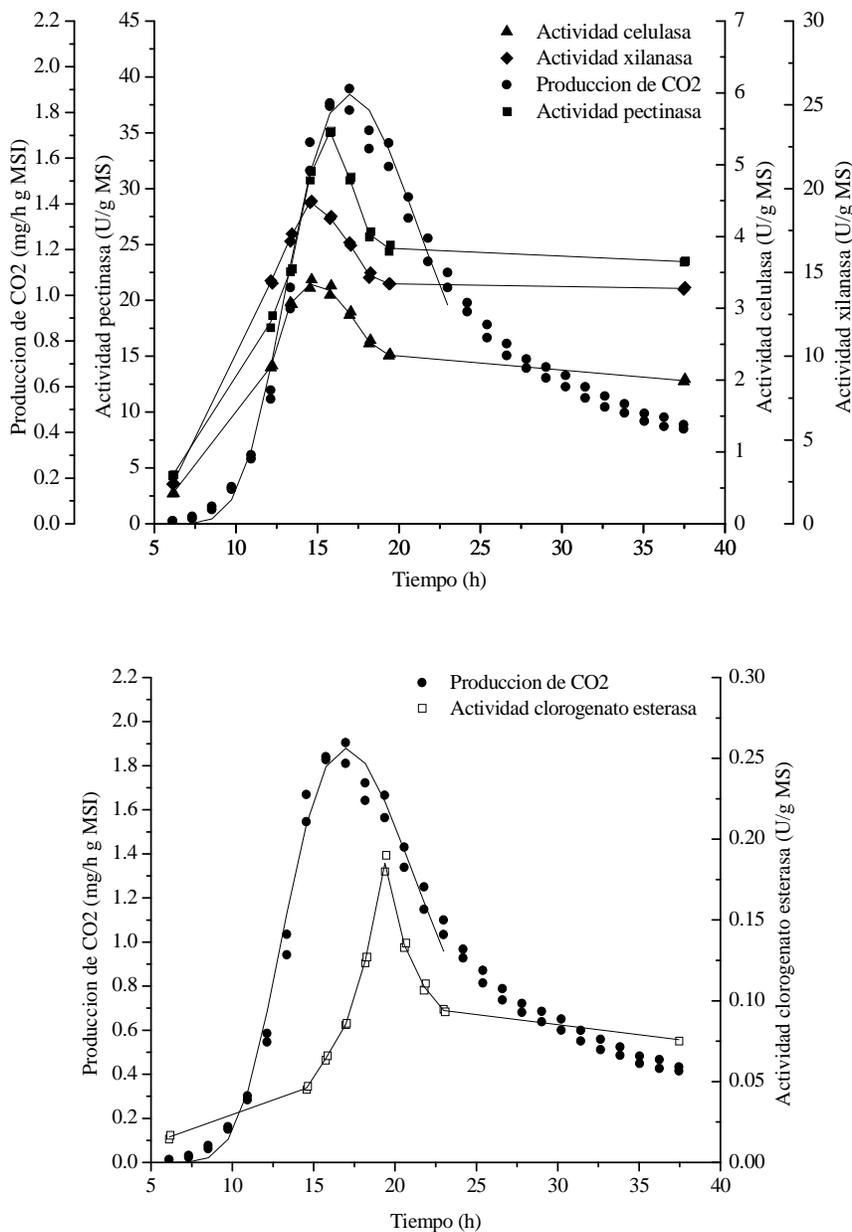
	<b>Tiempo</b> <b>(h)</b>	<b>APec</b> <b>(U/g MS)</b>	<b>Tiempo</b> <b>(h)</b>	<b>ACel</b> <b>(U/g MS)</b>	<b>Tiempo</b> <b>(h)</b>	<b>AXil</b> <b>(U/g MS)</b>	<b>Tiempo</b> <b>(h)</b>	<b>CIE</b> <b>(U/g MS)</b>
<b>M1</b>	14.0	21.4 ± 0.52	12.8	1.6 ± 0.06	12.8	17.1 ± 0.03	17.6	0.20 ± 0.01
<b>M2</b>	14.2	16.8 ± 0.21	13.0	1.4 ± 0.03	13.0	15.1 ± 0.05	17.8	0.33 ± 0.01
<b>M3</b>	14.6	4.6 ± 0.06	13.8	1.2 ± 0.01	13.8	9.8 ± 0.10	17.0	0.27 ± 0.01
<b>M4</b>	14.3	20.0 ± 0.26	13.5	1.6 ± 0.01	13.5	15.2 ± 0.08	16.7	0.12 ± 0.01
<b>M5</b>	12.8	16.7 ± 0.19	12.0	1.2 ± 0.01	12.0	15.7 ± 0.24	14.4	0.24 ± 0.01
<b>M6</b>	13.3	21.7 ± 0.04	12.5	1.8 ± 0.03	12.5	15.4 ± 0.06	14.9	0.10 ± 0.01
<b>M7</b>	18.0	17.5 ± 0.22	16.8	1.5 ± 0.09	16.8	14.3 ± 0.02	21.6	0.28 ± 0.01
<b>M8</b>	15.7	35.1 ± 0.05	14.5	3.6 ± 0.08	14.5	19.2 ± 0.06	19.4	0.19 ± 0.01

Ensayos por cuadruplicado

La producción de enzimas también fue dependiente del tiempo, este factor no se contempló en el diseño experimental tipo Plackett-Burman. Sin embargo, es un factor importante ya que como se observa en los perfiles de APec, AXil, ACel y ACIE cada uno de los máximos de actividad enzimática se presentó en diferentes periodos de tiempo.

El máximo de la actividad CIE se presentó entre 2 h y 5 h después de los máximos de la APec. En la Figura 12.3, 12.4 y 12.5 se presentan ejemplos de los perfiles de actividad APec, AXil, ACel y ACIE. En el Anexo 3 se presentan los perfiles de actividad enzimática para los ensayos M1, M2, M4, M5 y M7.

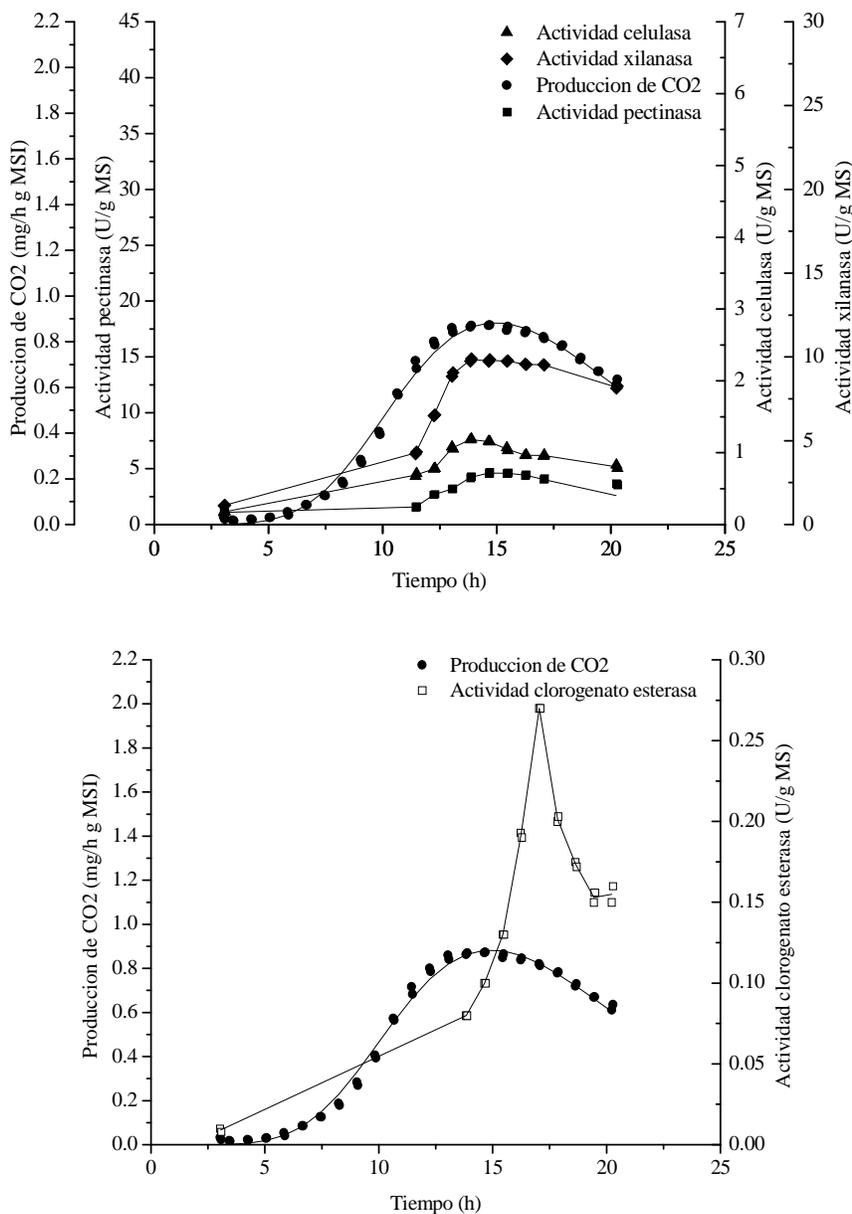
En la Figura 12.3 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M8 que presentó las mayores APec, Axil y ACel en comparación con los demás ensayos.



**Figura 12.3.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub>, durante la FMS de *R. pusillus* para las condiciones el ensayo M8

Se observa que la mayor APec y la máxima producción de CO<sub>2</sub> se alcanzaron entre las 15 y 16 h de fermentación. La mayor actividad APec, AXil y ACel, se presentó aproximadamente una hora antes que la máxima producción de CO<sub>2</sub> y la ACIE se presentó 4 h después de tener la máxima concentración de producción de CO<sub>2</sub>. También se puede observar que cuando se tiene la máxima APec se tiene una baja ACIE,  $0.06 \pm 0.01$  U/g MS.

En la Figura 12.4 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M3 que presentó la menor actividad APec, AXil y ACel en comparación con los demás ensayos.



**Figura 12.4.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub>, durante la FMS de *R. pusillus* para las condiciones el ensayo M3

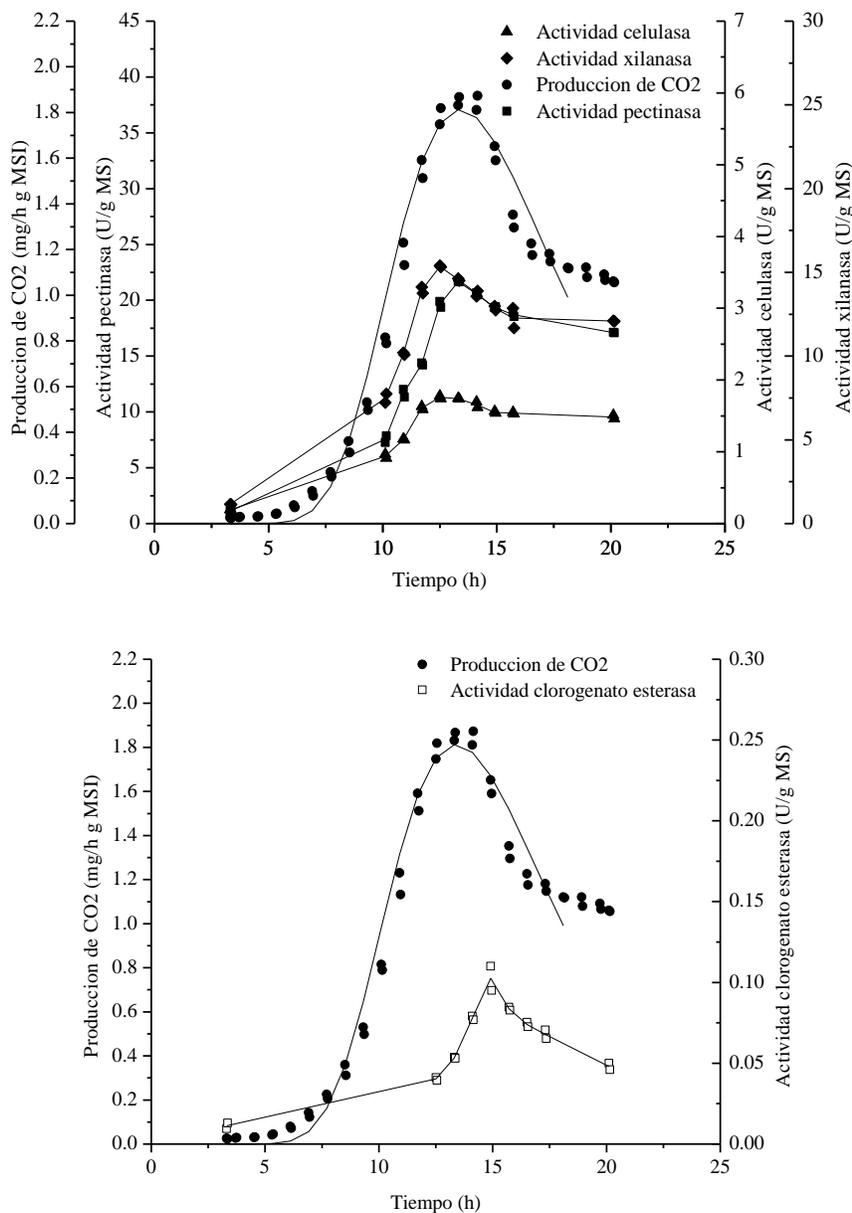
La mayor APec, AXil y ACel se presentaron cuando se obtuvo la máxima producción de CO<sub>2</sub> a las 14 h. En comparación con el ensayo M8 que presentó una

temperatura de incubación de 40°C y mayor concentración de la fuente de carbono y nitrógeno, la mayor APec del ensayo M3 incubado a 30°C permaneció constante por alrededor de 3 h con una desviación estándar del 10%.

La máxima ACIE se presentó 3 h después de tener la máxima concentración de producción de CO<sub>2</sub>. La ACIE en el ensayo M3 fue 1.4 veces mayor que la actividad presentada en el ensayo M8. Al momento de tener la máxima APec, AXil y ACel se tenía una ACIE de  $0.1 \pm 0.02$  U/g MS. Esta actividad es 1.7 veces mayor a la actividad presentada en el ensayo M8 para la APec.

En la Figura 12.5 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M6 que presentó la menor ACIE en comparación con los demás ensayos. Se observa que la mayor APec se presenta una hora antes de alcanzar la máxima producción de CO<sub>2</sub>. La ACel y AXil se presenta 2 h antes de tener la máxima producción de CO<sub>2</sub>. Las actividades despolimerizantes del ensayo M8 decrecen más rápido que las actividades del ensayo M6, esto podría deberse a la temperatura de incubación y a la concentración de la fuente de carbono utilizada. El ensayo M8 se incubó a 40°C, mientras que el ensayo M6 fue incubado a 30°C, esto sugiere que la temperatura de incubación afecta la estabilidad de las enzimas, por lo tanto la APec, AXil y ACel permanecen por más tiempo a una 30°C que a 40°C. Con respecto a la fuente de carbono se observa que el ensayo M8 presentó la mayor concentración de sacarosa y maltosa, lo que pudo ocasionar un efecto de represión catabólica sobre las actividades enzimáticas medidas.

La máxima ACIE se presentó 1 hora después de alcanzar la máxima producción de CO<sub>2</sub>. La ACIE de los ensayos M3 y M8 fueron 2.7 y 1.9 veces mayor a la actividad medida en el ensayo M6. Al momento de tener la mayor APec, la ACIE fue de  $0.05 \pm 0.01$  U/g MS lo que es prácticamente igual a la ACIE medida en el ensayo M8 y la mitad de la ACIE presente en el ensayo M3 al momento de tener la máxima APec.



**Figura 12.5.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub>, durante la FMS de *R. pusillus* para las condiciones el ensayo M6

Para obtener altos rendimientos de extracción del ACI que se encuentra covalentemente unido a la pared celular de la PC es necesario determinar las condiciones óptimas de fermentación para la producción de APec, Axil y ACel y además, definir adecuadamente el tiempo de obtención del extracto enzimático.

Los resultados fueron analizados con ANOVA (Anexo 4) en donde se determinó si al menos uno de los factores ensayados es responsable de la variación de la variable de respuesta ( $H_A$ ).

$$H_0: \mu_i = \mu_j$$

$$H_A: \mu_i \neq \mu_j$$

Donde:  $i, j$  representa cada uno de los factores.

Con un nivel de significancia  $\alpha < 0.05$  se rechazó  $H_0$ . Se determinaron los efectos de los factores ( $x_i$ ) sobre las respuestas: APec, AXil, ACel y ACIE como sigue:

$$x_i = \frac{\sum Y(+)}{n} - \frac{\sum Y(-)}{n}$$

$\sum Y(+) = \sum Y(-)$  No hay un efecto del factor  $i$  sobre la variable respuesta.

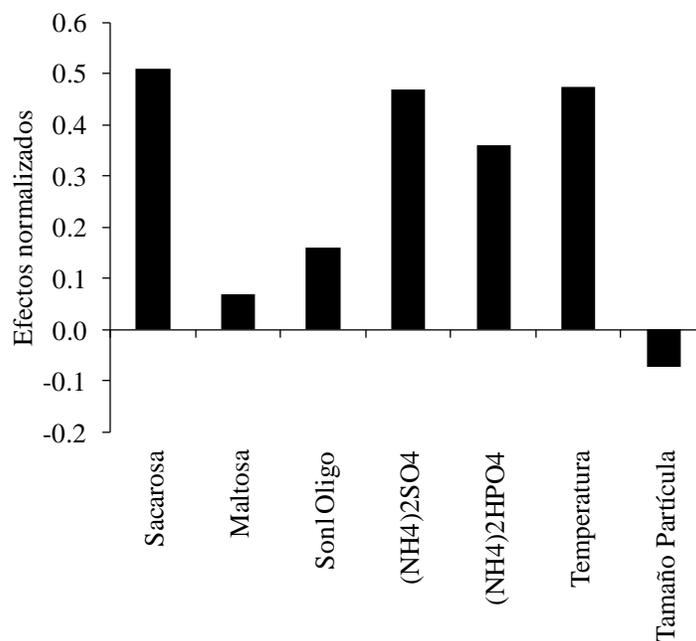
$\sum Y(+) > \sum Y(-)$  El efecto del factor  $i$  sobre la variable respuesta es positivo.

$\sum Y(+) < \sum Y(-)$  El efecto del factor  $i$  sobre la variable respuesta es negativo.

Ya que las actividades enzimáticas medidas presentaron diferentes órdenes de magnitud. El análisis estadístico de los efectos de los factores ( $x_i$ ) sobre la APec, AXil y ACel implicó normalizar las respuestas con la finalidad de poder determinar el efecto de cada uno de los factores estudiados con el mismo orden de magnitud como sigue:

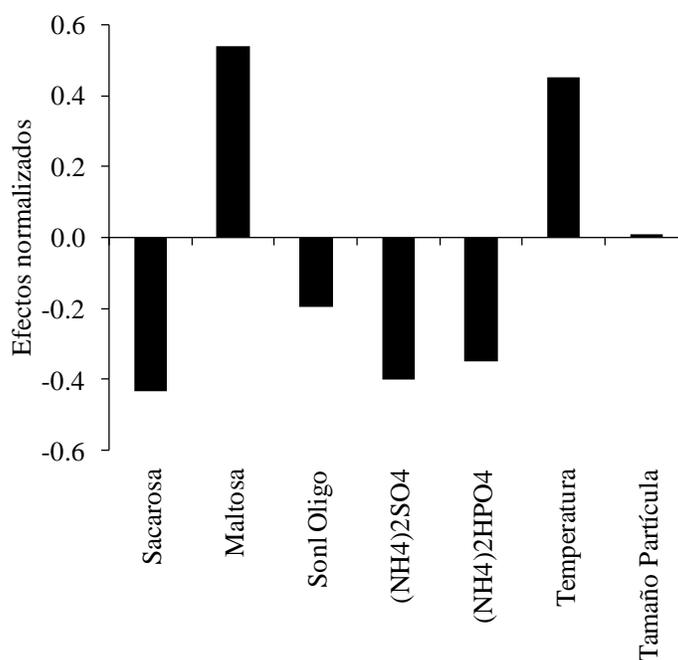
$$\frac{\nabla Y}{\|\nabla Y\|} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{\left[ \sum_{i=1}^n (x_i^2) \right]^{1/2}}$$

Se prosiguió a realizar el promedio de cada uno de los efectos normalizados de la APec, AXil y ACel. En la Figura 12.6 se presenta el diagrama de Pareto para los efectos normalizado de cada uno de los factores sobre la APec, AXil y ACel.



**Figura 12.6.** Diagrama de barras de los efectos de cada uno de los factores sobre la Apec, AXil y ACel

En la Figura 12.6 se observa que la actividad Apec, AXil y ACel es afectada con un  $p = 0.01$  por la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y temperatura. En la Figura 12.7 se presenta el efecto de cada uno de los factores sobre la ACIE.



**Figura 12.7.** Diagrama de barras de los efectos de cada uno de los factores sobre la ACIE

La ACIE es afectada ( $p = 0.01$ ) por la concentración de sacarosa, maltosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y temperatura. El efecto de la concentración de maltosa era esperado debido a que como se mostró en selección de cepas (sección 10), el utilizar la maltosa como fuente de carbono para la inducción de la enzima FAE en la fermentación en columnas promovió también la inducción de la enzima CIE (Asther y col., 2005). Se observaron efectos contrarios con relación a la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Es decir, la APec y AXil se verán favorecidas por el incremento en la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , mientras que la CIE se verá favorecida por la disminución de la concentración de estos mismos compuestos. Esta característica es favorable ya que se requiere que el extracto enzimático que se utilice para la extracción del ACI presente la menor actividad posible de la enzima CIE que es la responsable de hidrolizar el ACI en AQ y AC.

El diseño experimental tipo Plackett-Burman resultó ser una herramienta estadística útil y valiosa que nos permitió determinar con un número reducido de ensayos los factores que tienen un efecto sobre la expresión de la APec, AXil, ACel y ACIE. Los resultados obtenidos muestran que los factores concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , al aumentar su concentración tienen un efecto positivo en promover la APec, AXil y ACel y a su vez un efecto negativo en la ACIE responsable de la hidrólisis del ACI. Por lo que se observaron efectos contrarios con relación a la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en la ACIE y la APec, AXil y ACel.

El extracto del ensayo M8 del diseño experimental tipo Plackett-Burman presentó las mayores actividades pectinasa (35 U/g MS) y xilanasa (19.2 U/g MS) en comparación con los demás ensayos pero además presentó la mayor actividad clorogenato esterasa (0.2 U/g MS) lo cual se reflejaría en pérdidas del ácido clorogénico extraído por hidrólisis del mismo. Por otro lado el extracto del ensayo M6 presentó la más baja actividad clorogenato esterasa (0.1 U/g MS) y menor actividad pectinasa (21.7 U/g MS) y actividad xilanasa (15.4 U/g MS) en comparación con el extracto del ensayo M8. Las actividades despolimerizantes de los extractos del ensayo M8 y M6 se encontraron por debajo del intervalo establecido por el diseño de mezclas para tener la máxima extracción del ácido clorogénico de la pulpa de café.

El tiempo en el que se obtuvo el extracto enzimático de *R. pusillus* resultó ser un factor relevante debido a que la ACIE se presenta entre 2 y 4 horas después de tener la máxima APec, AXil y ACel, por lo que obtener el extracto cuando se tiene la máxima actividad despolimerizante también nos asegura que se tendrá presente una baja ACIE.

En la siguiente sección se presentan los resultados del diseño factorial central compuesto con el que se determinaron las condiciones óptimas de cultivo para la producción del extracto enzimático crudo que extraerá el ACI presente en al PC.

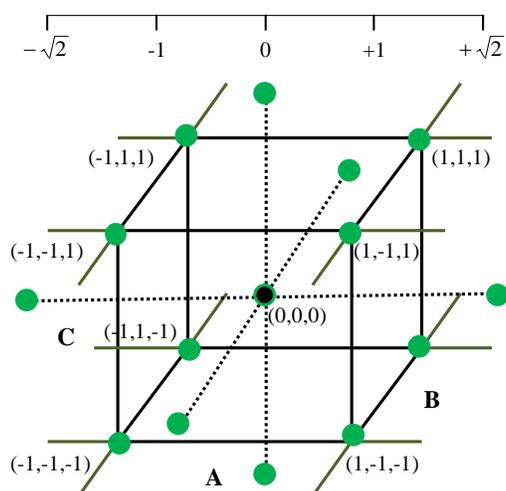
Los factores concentración de maltosa, solución de oligoelementos, temperatura y tamaño de partícula se fijaron en el valor medio de los intervalos ensayados. El estudio se realizó tomando únicamente a los factores concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . Se buscó determinar el intervalo de concentraciones de los factores que nos permitiera incrementar la APec, AXil y ACel y disminuir la ACIE en el extracto enzimático para finalmente realizar la extracción del ACI en la PC.

## **12.2 DISEÑO FACTORIAL CENTRAL COMPUESTO PARA LA PRODUCCIÓN DE ENZIMAS**

En el diseño experimental tipo Plackett-Burman se determinó que aumentar la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  tiene un efecto positivo sobre al APec, AXil y ACel y un efecto negativo sobre la ACIE. Con ayuda del diseño central compuesto con punto estrella se buscó determinar el intervalo de concentraciones de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  necesarias para incrementar la APec, AXil y ACel y disminuir la ACIE en el extracto enzimático para realizar la extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC. Los factores del diseño Plackett-Burman concentración de maltosa (3.5 g/100 g SS), solución de oligoelementos (0.6 ml/100g SS), temperatura (35°C) y tamaño de partícula (malla 16) se fijaron en el valor medio de los intervalos ensayados anteriormente.

En el diseño factorial central compuesto se ensayaron 16 corridas (M1-M16), las condiciones de ensayo se observan en la Tabla 12.4. La matriz fue construida con el programa STATISTICA versión 14 (Figura 12.8). Las variables respuesta medidas fueron

la APec, AXil, ACel y la ACIE. En la Figura 12.9 se muestra la matriz codificada del diseño factorial central compuesto.



**Figura 12.8.** Esquema del diseño factorial central compuesto. A:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; B:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; C: Sacarosa

	A	B	C
M1	+1	+1	+1
M2	-1	+1	+1
M3	+1	+1	-1
M4	-1	+1	-1
M5	+1	-1	+1
M6	-1	-1	+1
M7	+1	-1	-1
M8	-1	-1	-1
M9	0	$+\sqrt{2}$	0
M10	0	$-\sqrt{2}$	0
M11	0	0	$+\sqrt{2}$
M12	0	0	$-\sqrt{2}$
M13	$+\sqrt{2}$	0	0
M14	$-\sqrt{2}$	0	0
M15	0	0	0
M16	0	0	

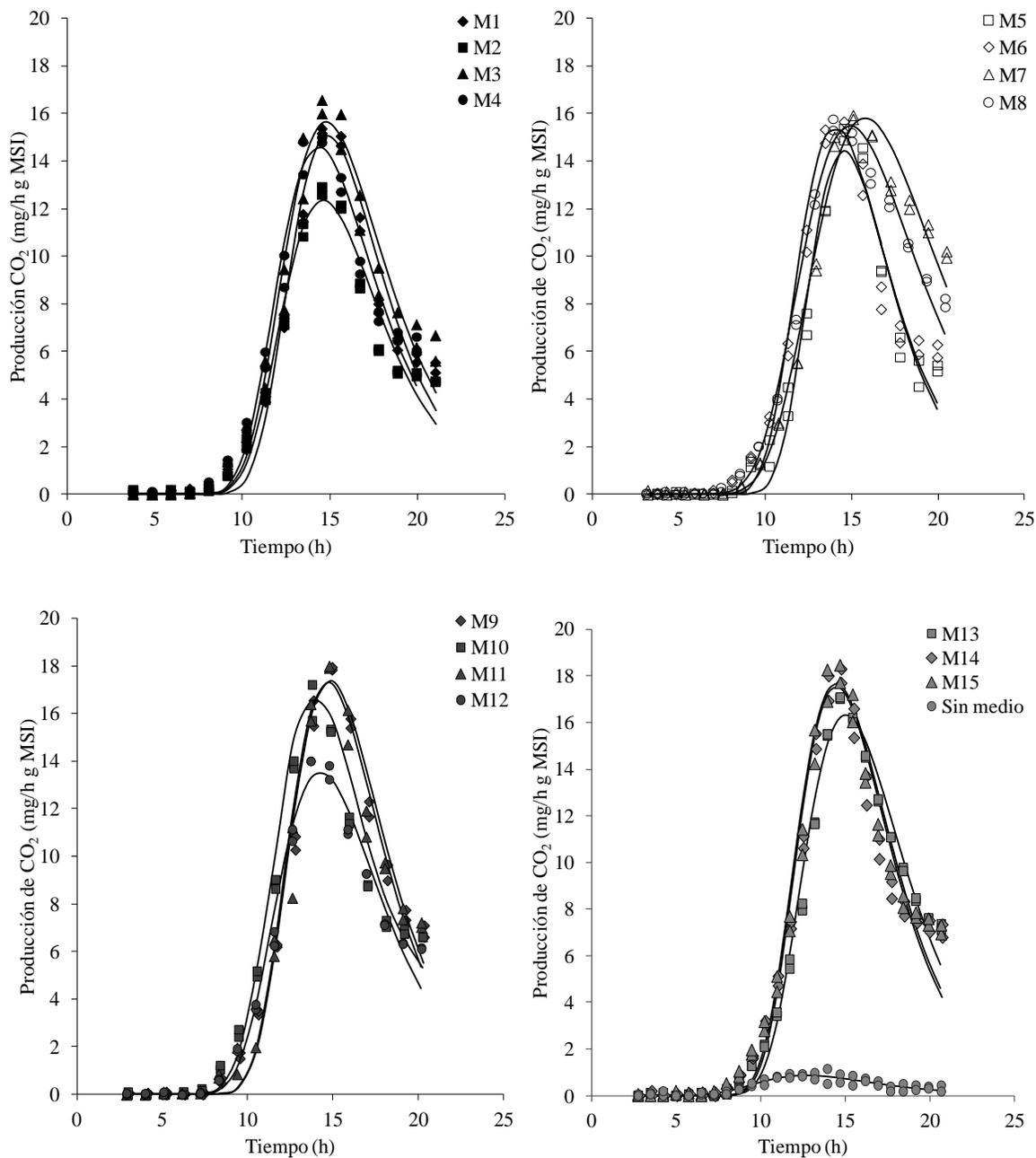
**Figura 12.9.** Diseño factorial central compuesto. A:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; B:  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; C: Sacarosa

Los niveles para el diseño central compuesto con punto estrella fueron  $+\sqrt{2}$ ,  $+1$ ,  $0$ ,  $-1$ ,  $-\sqrt{2}$  y la unidad de variación fue de 1.5. Los valores medios de los intervalos ensayos en el diseño Plackett-Burman fueron de 3.5 g/100g para la sacarosa y de 1.25 g/100g para el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . En el diseño experimental tipo Plackett-Burman se determinó que aumentar la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  tendría un efecto positivo sobre las actividades despolimerizantes y un efecto negativo sobre la ACIE por lo que se decidió que el nivel más bajo ( $-\sqrt{2}$ ) de ensayo no fuera más de una unidad menor con respecto al valor medio determinado en el diseño Plackett-Burman. El valor del nivel intermedio (0) para el diseño central compuesto con punto estrella para la concentración de sacarosa fue de 5 g/100 g, para el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y el  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  fue de 2.5 g /100 g.

**Tabla 12.4.** Condiciones para cada uno de los ensayos del diseño factorial central compuesto

	Factores		
	Concentración (g/100g SS)		
	Sacarosa	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
<b>M1</b>	6.5	3.5	3.5
<b>M2</b>	3.5	3.5	3.5
<b>M3</b>	6.5	3.5	1.5
<b>M4</b>	3.5	3.5	1.5
<b>M5</b>	6.5	1.5	3.5
<b>M6</b>	3.5	1.5	3.5
<b>M7</b>	6.5	1.5	1.5
<b>M8</b>	3.5	1.5	1.5
<b>M9</b>	5	3.9	2.5
<b>M10</b>	5	1.1	2.5
<b>M11</b>	5	2.5	3.9
<b>M12</b>	5	2.5	1.1
<b>M13</b>	7.1	2.5	2.5
<b>M14</b>	2.9	2.5	2.5
<b>M15</b>	5	2.5	2.5
<b>M16</b>	5	2.5	2.5

En la Figura 12.10 se muestra la producción de  $\text{CO}_2$  para las 16 corridas ensayadas en el diseño central compuesto con punto estrella. Las líneas continuas representan el ajuste con el modelo de Gompertz (Anexo 1).



**Figura 12.10.** Tasas de producción de  $\text{CO}_2$  de las 16 corridas (M1 – M16) del diseño factorial central compuesto

Se observa que la mayor TPC se presentó en las corridas M9, M11 y M15 con un valor de 18 mg CO<sub>2</sub>/h g MSI, aproximadamente lo cual se puede explicar por el hecho de que las corridas M9, M11 y M15 presentaron una concentración de 5 g sacarosa/100 g SS en el medio de cultivo. La corrida M13 que presentó la mayor concentración de sacarosa 7.1 g/100 g SS, alcanzó un valor de producción de CO<sub>2</sub> de 18.1 mg/h g MSI. El modelo de Gompertz ajustó con una R<sup>2</sup> > 0.95 para todos los ensayos.

En la Tabla 12.5 se presenta la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> para cada una de las corridas ensayadas.

**Tabla 12.5.** Actividad respiratoria estimada,  $a_w$ , pH y contenido de humedad medidos en cada una de las corridas del diseño factorial central compuesto

	CO <sub>2</sub> max (mg/g MSI)	$\mu_{CO_2}$ (h <sup>-1</sup> )	$a_w$		pH		Humedad	
			Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
<b>M1</b>	107.17	0.38	0.974	0.971	6.01	5.93	60.32	59.64
<b>M2</b>	92.63	0.36	0.979	0.977	6.00	5.76	60.34	59.49
<b>M3</b>	121.94	0.35	0.975	0.974	6.06	5.55	60.01	59.92
<b>M4</b>	109.70	0.36	0.979	0.977	5.97	5.81	60.13	57.65
<b>M5</b>	92.40	0.42	0.975	0.974	5.97	5.96	60.30	59.54
<b>M6</b>	107.97	0.39	0.977	0.976	6.03	5.87	60.28	56.33
<b>M7</b>	152.09	0.28	0.971	0.969	5.98	5.31	60.23	59.53
<b>M8</b>	141.12	0.30	0.974	0.974	5.99	5.35	60.24	57.79
<b>M9</b>	128.76	0.37	0.973	0.973	5.92	5.87	60.94	59.51
<b>M10</b>	122.51	0.34	0.971	0.968	5.85	5.45	60.28	58.80
<b>M11</b>	126.25	0.37	0.971	0.969	5.90	5.87	60.14	59.10
<b>M12</b>	110.03	0.33	0.974	0.973	5.93	5.48	59.85	58.72
<b>M13</b>	129.29	0.34	0.977	0.976	6.01	5.47	59.74	57.40
<b>M14</b>	128.03	0.37	0.974	0.973	6.02	5.89	59.95	59.81
<b>M15</b>	132.07	0.36	0.976	0.971	5.98	5.93	60.44	60.41
<b>M16</b>	131.76	0.36	0.976	0.972	6.00	5.89	64.71	59.31

Ensayos por duplicado

En la Tabla 12.5 se observa que la corrida M7 presentó la mayor cantidad de CO<sub>2</sub> producido. Mientras que las corridas M2 y M5 presentaron la menor cantidad de CO<sub>2</sub> producido durante la FMS. La PMSI medida en la corrida M7 fue de 10.5%, para M2 y M5

de 6.2%. La PMSI estimada a partir del CO<sub>2</sub> producido fue para la corrida M7 de 10.4% y para M2 y M5 de 6.3%. Ambas pérdidas de PMSI fueron similares.

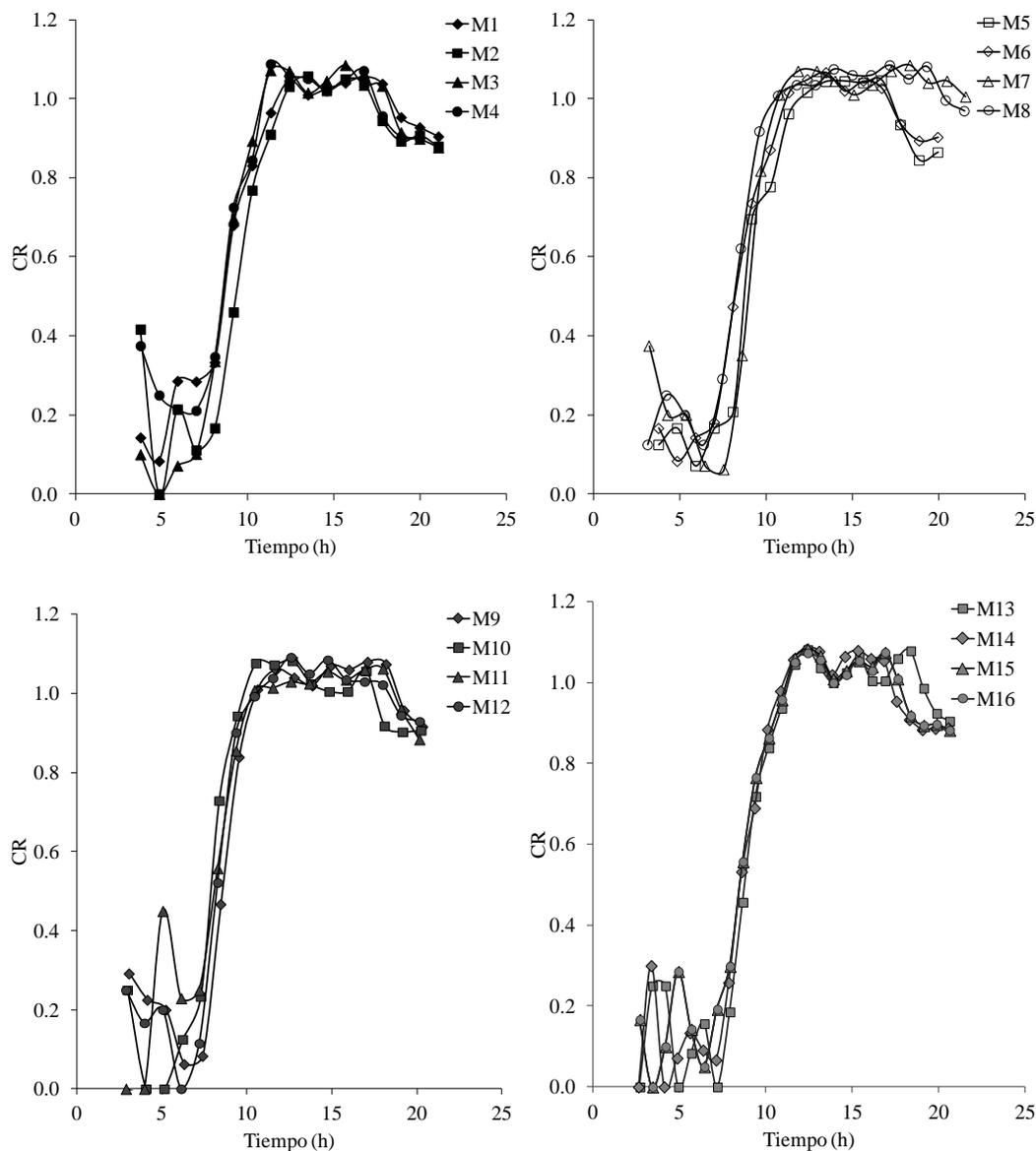
La corrida M5 presentó la máxima  $\mu_{CO_2}$  sin embargo, no presentó la máxima tasa de producción de CO<sub>2</sub> con respecto a las demás corridas ensayadas. Por otro lado las corridas M7 y M8 presentaron la menor  $\mu_{CO_2}$  con respecto a las demás corridas ensayadas. Las corridas M7 y M8 fueron medios de cultivo que tuvieron las concentraciones más bajas de la fuente de nitrógeno 1.5 g/100 g SS para el (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.

La  $a_w$  es expresada como el cociente de la presión de vapor generado por el agua en el medio de cultivo entre la presión de vapor del agua pura a las mismas condiciones. En la Tabla 12.5 se observa que la  $a_w$  fue menor a 0.98 al inicio y al final de la FMS de todas las corridas ensayadas. Esto puede deberse a la concentración de nutrientes utilizados en los medios de cultivo. Valores de  $a_w$  por debajo de 0.9 afecta directamente en la producción de las enzimas producidas por FMS (Pandey, 2003).

El contenido de humedad de todas las corridas al inicio de la FMS fue aproximadamente de 60%. Al final de la FMS el contenido de humedad disminuyó entre 1 y 2 unidades para las 16 corridas ensayadas.

El cociente respiratorio (CR) es otro parámetro que indica cómo evoluciona un cultivo. Con la ecuación estequiométrica de la oxidación de hexosas (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) y a partir de la TPC y la TCO se puede determinar el CR que es el cociente de los moles de CO<sub>2</sub> producidos entre los moles de O<sub>2</sub> consumidos. El CR tendrá un valor de 1 cuando las moles de O<sub>2</sub> consumido por la oxidación de las hexosas sean iguales a las moles de CO<sub>2</sub> producido.

El CR puede indicar el tipo de cinética que se está llevando a cabo, en función del crecimiento microbiano en la FMS (Pandey y col., 2008). En la Figura 12.11 se muestra el CR calculado para cada una de las corridas ensayadas no tiene un valor constante de uno, por lo que la producción de algunos metabolitos extracelulares está asociada parcialmente al crecimiento, tal es el caso de la inducción de la producción de enzimas (Pandey y col., 2008).



**Figura 12.11.** Coeficiente respiratorio de las 16 corridas ensayadas (M1 – M16) del diseño factorial central compuesto

En las 16 corridas ensayadas se observa que en las primeras 10 h de cultivo el CR fue  $< 0.4$ , lo cual correspondió con la fase lag de los cultivos. De las 12 a las 18 h el CR varió entre los valores de 1 y 1.1. Posiblemente es durante la fase exponencial que *R. pusillus* empieza a oxidar las hexosas presentes en el medio de cultivo para producir biomasa. Valores del CR mayores a uno indican que la aireación durante la FMS no se realizó de manera adecuada, provocando que existiera una mayor concentración de  $\text{CO}_2$  en el sistema estimulando la presencia de zonas anaerobias (Pandey y col., 2008). El que no se

tenga una aireación adecuada se puede deber a la compactación del soporte en el tiempo y además a que la producción de biomasa fuera tal que disminuyera la cantidad de espacios vacíos, pero este no fue el caso. El CR también puede tener valores mayores a uno en el caso de que el O<sub>2</sub> que se utilice para la oxidación de las hexosas no sólo provenga del aire que se está suministrando a la FMS si no también al O<sub>2</sub> presente en la materia que se está fermentado, lo que ocasiona un menor consumo del O<sub>2</sub> proveniente del aire (Pandey y col., 2008). Por otra parte el CR empezó a decrecer después de las 18 h de cultivo.

En la Tabla 12.6 se presentan las APec, AXil y ACIE medidas por cada corrida realizada en el diseño factorial central compuesto. Las mediciones de las variables de respuesta se encuentran ordenadas en base a la concentración de sacarosa ensayada. Para el caso de la ACel debido a que no hubo variaciones significativas en todas las corridas ensayadas (M1 – M16), por lo que, no son reportadas en la Tabla 12.6. Los valores de ACel se encontraron en el intervalo de  $11.4 \pm 0.9$  a  $10.1 \pm 1.2$  U/ g MS.

**Tabla 12.6.** Variables respuesta medidas en el diseño factorial central compuesto

	Sacarosa	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	APec (U/g MS)	AXil (U/g MS)	ACIE (U/g MS)
<b>M14</b>	2.9	2.5	2.5	40.9 ± 0.7	22.9 ± 0.3	0.22 ± 0.01
<b>M8</b>	3.5	1.5	1.5	40.9 ± 0.2	26.4 ± 1.3	0.26 ± 0.01
<b>M6</b>	3.5	1.5	3.5	49.0 ± 0.8	27.2 ± 0.4	0.21 ± 0.00
<b>M4</b>	3.5	3.5	1.5	47.2 ± 0.8	26.3 ± 0.7	0.20 ± 0.01
<b>M2</b>	3.5	3.5	3.5	38.0 ± 1.1	23.3 ± 0.4	0.16 ± 0.01
<b>M10</b>	5.0	1.1	2.5	53.8 ± 1.5	29.6 ± 0.6	0.16 ± 0.02
<b>M12</b>	5.0	2.5	1.1	43.3 ± 0.0	25.4 ± 0.1	0.16 ± 0.01
<b>M15</b>	5.0	2.5	2.5	64.8 ± 3.0	34.6 ± 0.6	0.16 ± 0.00
<b>M16</b>	5.0	2.5	2.5	64.6 ± 1.3	34.2 ± 0.7	0.16 ± 0.01
<b>M11</b>	5.0	2.5	3.9	64.2 ± 0.4	33.0 ± 1.3	0.15 ± 0.01
<b>M9</b>	5.0	3.9	2.5	63.9 ± 0.5	33.4 ± 0.6	0.16 ± 0.00
<b>M7</b>	6.5	1.5	1.5	51.1 ± 0.5	28.6 ± 0.2	0.14 ± 0.01
<b>M5</b>	6.5	1.5	3.5	48.9 ± 0.3	28.0 ± 0.3	0.15 ± 0.02
<b>M3</b>	6.5	3.5	1.5	57.9 ± 0.6	30.3 ± 1.7	0.13 ± 0.01
<b>M1</b>	6.5	3.5	3.5	51.5 ± 0.7	27.7 ± 1.7	0.13 ± 0.01
<b>M13</b>	7.1	2.5	2.5	56.2 ± 0.2	30.6 ± 0.1	0.12 ± 0.02

Ensayos por cuadruplicado

En la Tabla 12.6 se observa que cuando se incrementa la concentración de 2.9 a 5 g de sacarosa/100 g de SS se incrementa la APec y AXil. De una concentración de sacarosa de 5 a 7.1 g/100 g de SS se observa que la APec y AXil decrece o permanece constante. Esto sugiere que puede haber mecanismos de regulación por fuente de carbono o por pH debido a las condiciones de cultivo ensayadas. La represión catabólica es parte de uno de los mecanismos de regulación por fuente de carbono. La represión del sistema xilanolítico se da por la presencia de fuente de carbono de bajo peso molecular como xilosa, arabinosa y xilobiosa (Vries y col., 2002). La L-arabinosa, L-ramnosa y AF provocan la expresión de sub-series de genes pectinolíticos. Los principales represores de los sistemas pectinolíticos son las fuentes de carbono fácilmente metabolizables como glucosa, fructosa y sacarosa. La proteína CreA es el principal elemento involucrado en el proceso de la represión catabólica de las pectinasas (Vries, 2003).

Otro mecanismo de regulación es el pH. El pH del medio de cultivo se va modificando conforme se producen metabolitos por parte de los microorganismos que se desarrollan en el medio. La expresión de genes de *A. nidulans* puede ser regulada por el pH del medio. Las poligalacturonasas son secretadas a bajos pH (3 a 4), mientras que las pectinliasas son secretadas cuando aumenta el pH del medio. La regulación por el pH de la expresión de las enzimas poligalacturonasas está mediada por la acción de la proteína PacC (Vries y Visser, 2001).

En el caso de la ACIE se observa que la actividad empieza a disminuir conforme aumenta la concentración de sacarosa (Tabla 12.6). Este comportamiento era esperado por los resultados antes mostrados en el diseño experimental tipo Plackett-Burman.

A continuación se muestra el análisis estadístico del diseño central compuesto. Las variables de respuesta medidas fueron la APec, la AXil y ACIE. Se buscó promover la presencia de la APec y AXil y minimizar la ACIE. El análisis estadístico constó de 2 etapas: a) Determinar el modelo que mejor se ajustara a las variables de respuesta medidas y b) Determinar los valores de concentración de sacarosa y fuente de nitrógeno que promuevan la APec y AXil. El modelo de segundo orden para el diseño central compuesto con 3 factores es:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

Donde:  $X_1$ : Sacarosa;  $X_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $X_3$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

El modelo que mejor se ajustó a la variable respuesta APec con un nivel de significancia  $\alpha < 0.04$ , una  $R^2$  de 0.8890 y un error estándar de 0.32 fue (Anexo 5):

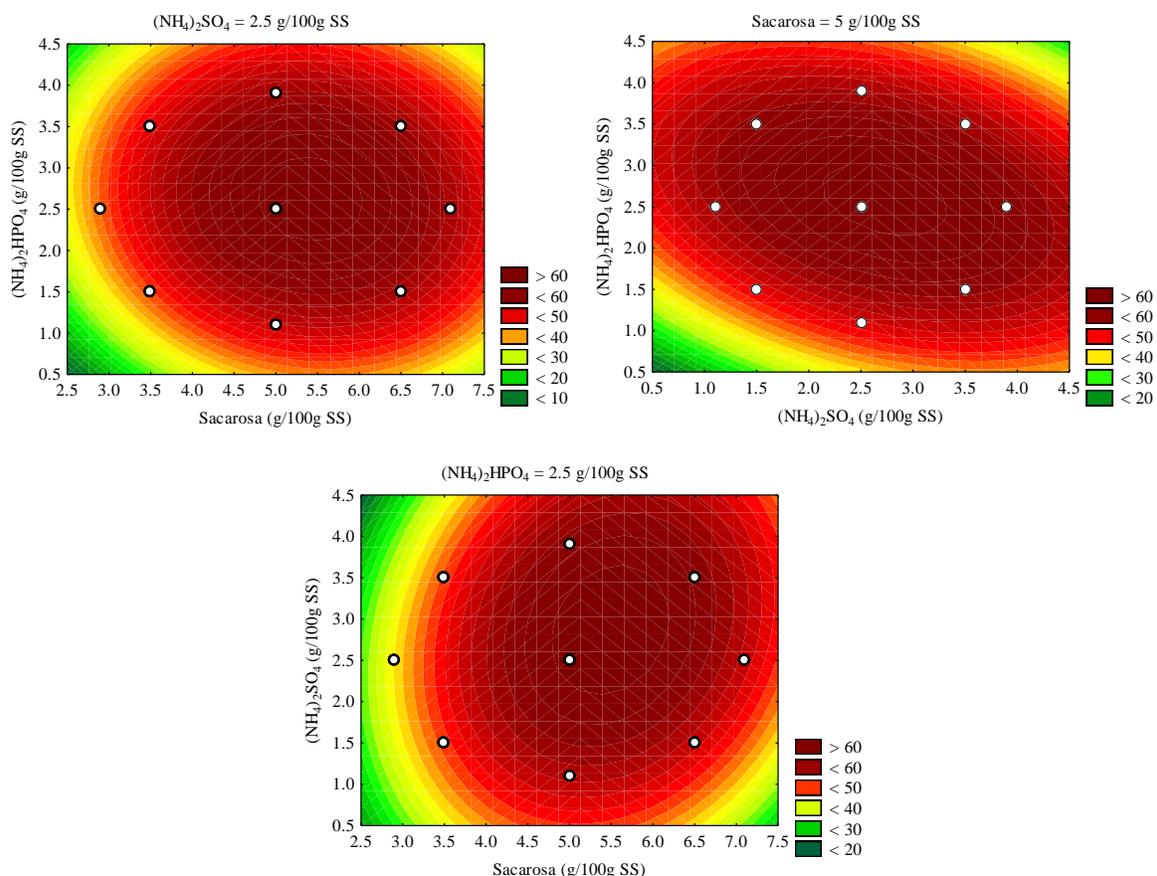
$$Y = -113.27 + 38.21X_1 + 17.19X_2 + 39.31X_3 - 3.65X_1^2 - 2.95X_2^2 - 5.55X_3^2 + 1.18X_1X_2 - 0.63X_1X_3 - 2.70X_2X_3$$

Donde:  $X_1$ : Sacarosa;  $X_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $X_3$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

En la Figura 12.12 se presentan las curvas de nivel de los factores de concentración de sacarosa, de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  sobre la APec. Los círculos blancos representan cada uno de los ensayos realizados en el diseño central compuesto con punto estrella. La intensidad de la variable respuesta estuvo dada por los colores que fueron de verde a rojo, donde el color rojo representa la máxima intensidad de la variable respuesta que es la APec.

Se observa que los intervalos de los factores donde se presenta la zona de mayor producción de la APec para la concentración de fuente de carbono y nitrógeno son (g/100 g SS):  $5 \leq \text{Sacarosa} \leq 6$ ,  $2.1 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 3.5$ ,  $2.1 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 2.9$ . En la Tabla 12.6 se observa que esta zona se presentó cerca de las condiciones en que se llevaron a cabo las corridas M15 y M16.

A partir del modelo se determinó que el punto en el que la derivada se hace cero (máximo valor de APec) sería cuando la concentración (g/100g SS) de sacarosa es 5.48, la de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es 2.84 y la de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  es 2.54. En este punto la APec estimada sería de aproximadamente 65.8 U/g MS. Esta APec fue 3 y 1.9 veces mayor a la medida en los extractos enzimáticos producidos en las corridas M6 (21.7 U/g MS) y M8 (35.1 U/g MS), respectivamente del diseño experimental tipo Plackett-Burman.



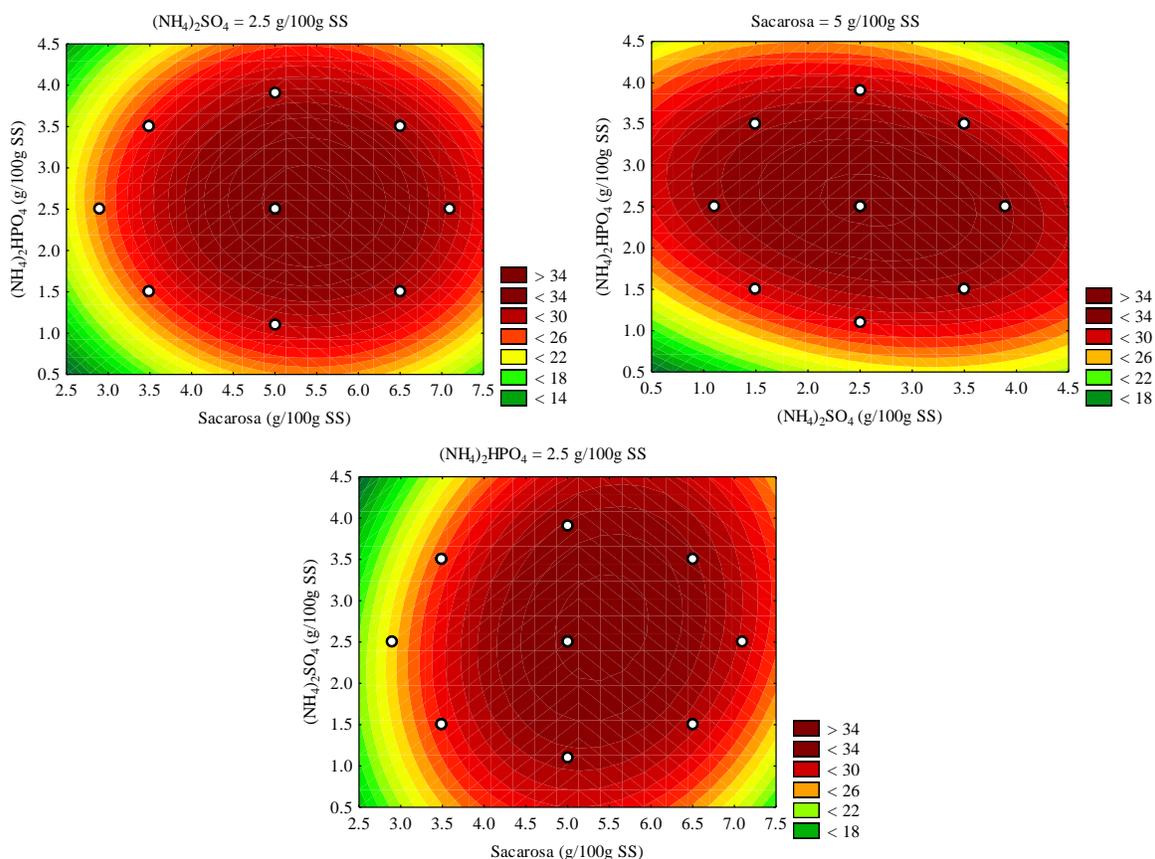
**Figura 12.12.** Curvas de nivel para los 3 factores ensayados sobre la APEC en el diseño factorial central compuesto. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

El modelo que mejor se ajustó a la variable respuesta AXil con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$ , una  $R^2$  de 0.8639 y un error estándar de 0.51 fue (Anexo 5):

$$Y = -36.06 + 16.40X_1 + 5.73X_2 + 14.55X_3 - 1.61X_1^2 - 1.19X_2^2 - 2.37X_3^2 + 0.46X_1X_2 - 0.09X_1X_3 - 0.74X_2X_3$$

Donde:  $X_1$ : Sacarosa;  $X_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $X_3$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

En la Figura 12.13 se presentan las curvas de nivel de los factores de concentración de sacarosa, de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  sobre la AXil. Los círculos blancos representan cada uno de los ensayos realizados en el diseño central compuesto con punto estrella. La intensidad de la variable respuesta estuvo dada por los colores que fueron de verde a rojo, donde el color rojo representa la máxima intensidad de la variable respuesta que es la AXil.



**Figura 12.13.** Curvas de nivel para los 3 factores ensayados sobre la AXil en el diseño factorial central compuesto. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

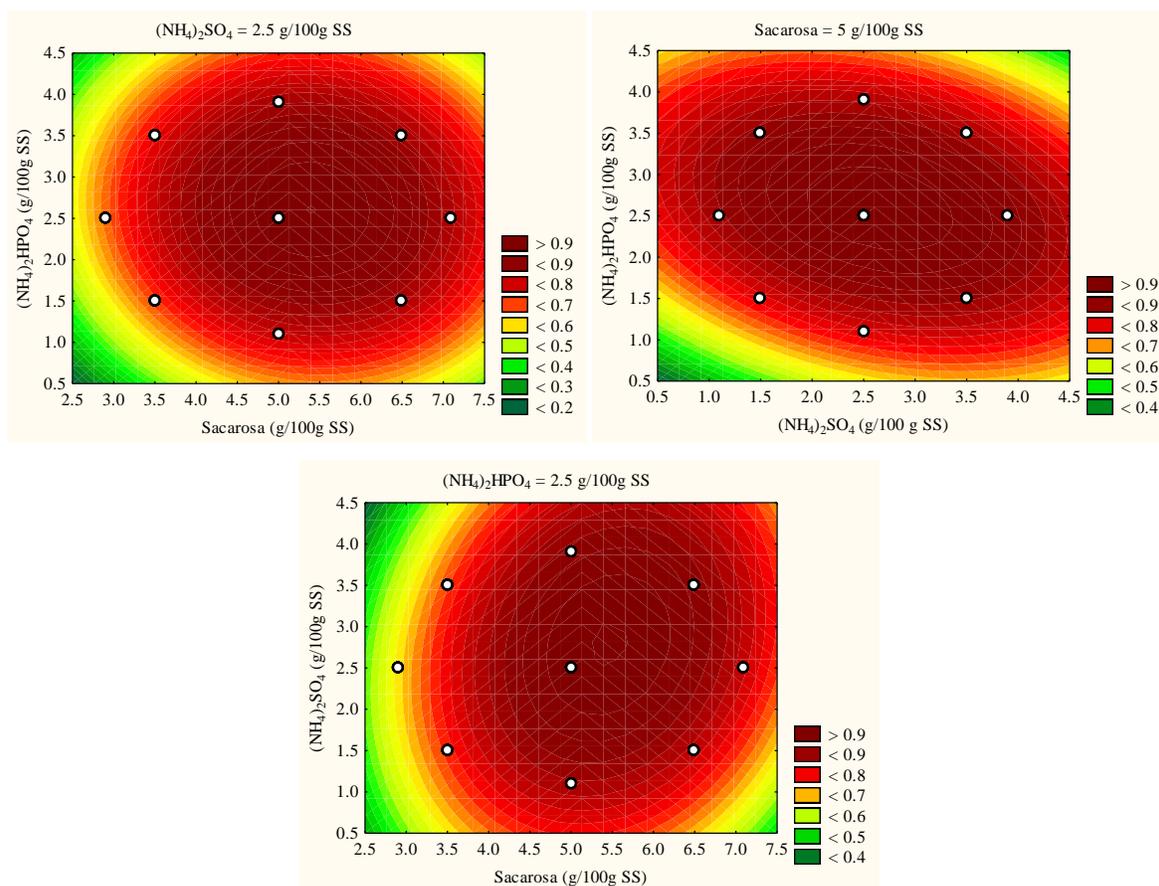
En la Tabla 12.6 se observa que la mayor AXil se presentó cerca de las corridas M15 y M16, misma situación que para el caso de la APec. En la Figura 12.13 se observa que los intervalos donde se presenta la zona de mayor producción de la AXil para la fuente de carbono y nitrógeno son (g/100 g SS):  $4.9 \leq \text{Sacarosa} \leq 6$ ,  $2 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 3.1$ ,  $1.9 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 2.9$ .

Se determinó a partir del modelo ajustado que el punto en el que la derivada se hace cero (máximo valor de AXil) sería cuando la concentración (g/100g SS) de sacarosa es 5.41, la de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es 2.66 y la de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.56. En este punto la AXil estimada sería de aproximadamente 34.5 U/g MS. Esta AXil fue 2.2 y 1.8 veces mayor a la medida en los extractos enzimáticos producidos en las corridas M6 (15.4 U/g MS) y M8 (19.2 U/g MS), respectivamente del diseño experimental tipo Plackett-Burman.

Las superficies de respuesta de la APec y la AXil mostraron comportamientos similares ( $\alpha < 0.05$ ) por lo que fue posible realizar la normalización de las variables de respuesta ( $x_i$ ) con la finalidad de determinar los intervalos de las concentraciones de sacarosa y la fuente de nitrógeno que nos permitieran tener la mayor APec y AXil.

$$\frac{\nabla Y}{\|\nabla Y\|} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{\left[ \sum_{i=1}^n (x_i^2) \right]^{1/2}}$$

En la Figura 12.14 se muestran las curvas de nivel normalizadas con una  $R^2$  de 0.8335 y un nivel de significancia  $\alpha < 0.01$ .



**Figura 12.14.** Curvas de nivel normalizadas para los 3 factores ensayados sobre la APec y AXil en el diseño factorial central compuesto. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

Los intervalos donde se presenta la zona de mayor producción de las APec y AXil para la fuente de carbono y nitrógeno son (g/100 g SS):  $4.9 \leq \text{Sacarosa} \leq 6$ ,  $2 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 3.6$ ,  $2.1 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 3.2$ . A partir del modelo ajustado se determinó que el punto en el que la derivada se hace cero (valores máximos de APec y AXil) sería cuando la concentración (g/100g SS) de sacarosa es 5.44, la de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  es 2.76 y la de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.55.

En el caso de la variable de respuesta, ACIE el modelo que mejor ajustó con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  y una  $R^2$  de 0.9358 fue (Anexo 5):

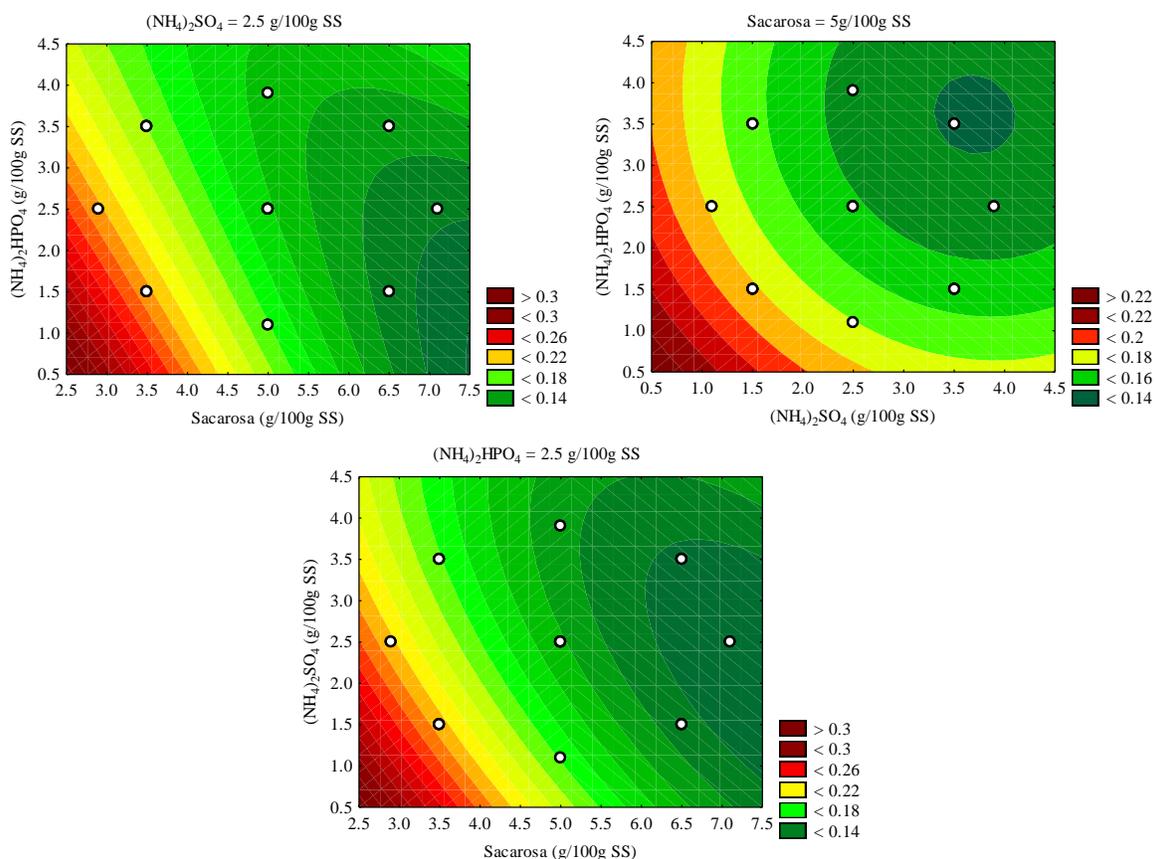
$$Y = 0.686 - 0.108X_1 - 0.070X_2 - 0.071X_3 + 0.005X_1^2 + 0.006X_1X_2 + 0.009X_1X_3$$

Donde:  $X_1$ : Sacarosa;  $X_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $X_3$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

En la Figura 12.15 se presentan las curvas de nivel de los factores sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  sobre la ACIE. Los círculos blancos representaron cada uno de los ensayos realizados en el diseño central compuesto con punto estrella. La intensidad de la variable respuesta estuvo dada por los colores que fueron de verde a rojo, donde el color rojo representó el máximo valor de la variable respuesta.

Se observa que el incremento de la concentración de sacarosa tiene el efecto más importante en la inhibición de la ACIE. Los intervalos donde se presenta la zona de menor ACIE para la fuente de carbono y nitrógeno son (g/100 g SS):  $5.4 \leq \text{Sacarosa} \leq 7.5$ ,  $2.5 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 4.5$ ,  $1.9 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 4.5$ .

La ACIE medida no tuvo una diferencia significativa con respecto a la medida en los extractos enzimáticos producidos en la corrida M6 ( $0.10 \pm 0.01$ ) donde se presentó la menor ACIE en el diseño experimental tipo Plackett-Burman.



**Figura 12.15.** Curvas de nivel para los 3 factores ensayados sobre la ACIE en el diseño factorial central compuesto. Los círculos vacíos indican las condiciones de experimentación

Con los resultados antes mostrados podemos concluir que el diseño factorial central compuesto permitió determinar los intervalos de concentraciones óptimas de sacarosa y de fuente de nitrógeno para tener la mayor A<sub>Pec</sub> y AXil y la menor ACIE.

Los intervalos donde se presenta la zona de mayor producción de las A<sub>Pec</sub> y AXil para la sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  se encontraron contenidos en el los intervalos de la zona de menor ACIE. Esto permitirá tener un extracto enzimático que presente una buena A<sub>Pec</sub> y AXil y poca ACIE.

La ACIE se vio mayormente afectada por la concentración de sacarosa ya que al incrementar esta concentración la ACIE decreció hasta un valor de 0.1 U/g MS.

Habiendo determinado los intervalos de las concentraciones de sacarosa y de fuente de nitrógeno para las A<sub>Pec</sub> y AXil se continuó a producir los extractos enzimáticos crudos

para evaluar la extracción del ACI esterificado a la PC. El ensayo se realizó tomando los valores como sigue (g/100 g SS): sacarosa, 5.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.8 y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.6. Estos valores se encuentran en el intervalo de baja ACIE y alta APec y AXil. Se mantuvieron constantes todas las condiciones de cultivo del ensayo.

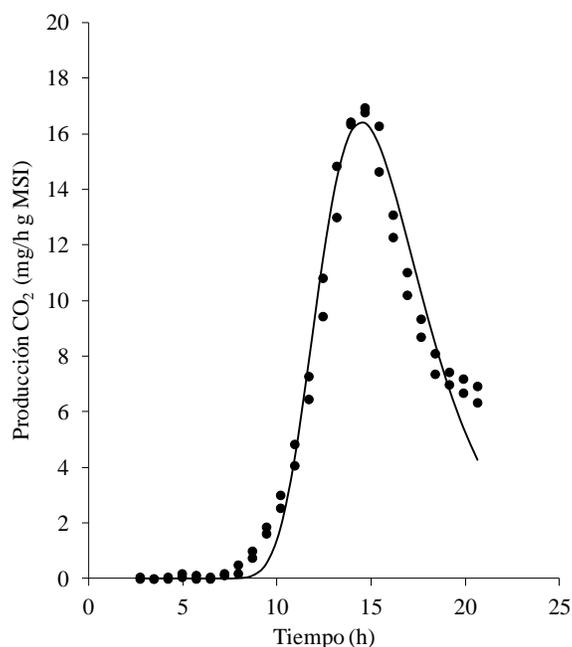
### **12.3 EVALUACIÓN DE LA EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO PRESENTE EN LA PULPA DE CAFÉ**

En esta sección se presentan los resultados de la evaluación de la extracción enzimática del ACI con el extracto crudo producido por FMS con las condiciones de cultivo optimizadas. Primeramente se presentan los resultados de la producción y obtención del extracto enzimático de *R. pusillus* por FMS y después se presentan los resultados de la extracción enzimática del ACI presente en la PC con el extracto crudo.

#### **12.3.1 Obtención del extracto enzimático por fermentación en medio sólido con las condiciones optimizadas**

Se determinó con ayuda del diseño central compuesto con punto estrella las condiciones de cultivo óptimas para producir las enzimas pectinasa y xilanasas como sigue (g/100 g SS): sacarosa, 5.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.8 y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.6. Se mantuvieron todas las condiciones de cultivo (concentración de maltosa, solución de oligoelementos, temperatura y tamaño de partícula) constante. Se produjeron los extractos enzimáticos crudos usando a *R. pusillus* por FMS. Para después extraer el ACI presente en la PC.

En la Figura 12.16 se presenta la producción de  $\text{CO}_2$  medida para las condiciones de cultivo determinadas en el diseño central compuesto con punto estrella. La línea continua representa el modelo ajustado de Gompertz.



**Figura 12.16.** Producción de CO<sub>2</sub> bajo las condiciones de cultivo determinadas en el diseño factorial central compuesto

En la Figura 12.16 se observa que la máxima TPC para este ensayo se alcanzó a las 15 h de cultivo, el valor fue de  $16.7 \pm 1.5$  mg CO<sub>2</sub>/h g MSI. A partir del modelo de Gompertz con una  $R^2 > 0.97$  se determinó que la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) para el ensayo fue de  $0.36 \text{ h}^{-1}$ .

La cantidad total de CO<sub>2</sub> producido fue de 147.5 mg/g MSI. La pérdida de materia seca inicial (PMSI) por gravimetría fue 11.3%. La PMSI estimada por la producción de CO<sub>2</sub> utilizando la ecuación estequiométrica de la oxidación de las hexosas fue 10.1%. La mayor PMSI se presentó por gravimetría debido a que la PMSI estimada por la producción de CO<sub>2</sub> no considera la generación de biomasa u otros productos durante la FMS.

La  $a_w$  al inicio del ensayo fue de 0.977, la humedad fue aproximadamente del 60%, al final de la FMS no se observaron diferencias significativas en estas variables. El pH al inicio de la FMS en el ensayo fue aproximadamente de 6. Al final de la FMS el pH fue de aproximadamente de 5, esto se debió tanto a la producción de ácidos orgánicos durante el crecimiento de *R. pusillus*, también a la fuente de nitrógeno utilizada en los ensayos.

En la Tabla 12.7 se presenta la APec y la AXil medida y estimada en cada uno de los ensayos por los modelos propuestos en el diseño central compuesto con punto estrella.

**Tabla 12.7.** Actividades enzimáticas medidas y estimadas para cada uno de los ensayos

ACel (U/g MS)	FAE (U/g MS)	ACIE (U/g MS)	Medido		Estimado	
			APec (U/g MS)	AXil (U/g MS)	APec (U/g MS)	AXil (U/g MS)
10.5 ± 1.1	16.1 ± 1.5	0.11 ± 0.03	67.67 ± 1.7	36.68 ± 1.8	65.70	34.39

Ensayos por duplicado

Las APec y AXil medidas no presentaron diferencias significativas con respecto a las APec y AXil estimadas por los modelos propuestos en el diseño factorial central compuesto con errores estándar de 0.32 y 0.51, respectivamente. La ACel fue 2.9 veces mayor a la obtenida en la corrida M8 del diseño experimental tipo Plackett-Burman. Mientras que la actividad de la FAE fue 1.2 veces mayor a la obtenida en el extracto crudo producido por fermentación en columnas donde se usó 50% del medio de Asther y col. (2002), reportado para promover la producción de la FAE.

En los estudios de fermentación en matraces y en columnas la FAE y la CIE presentaron el mismo perfil de actividad enzimática por lo que se esperaba que al decrecer la ACIE también decreciera la actividad de la FAE lo cual no ocurrió. Por lo que se podría decir que la FAE y la CIE no son la misma enzima. Para explicar lo anterior se sugieren varias hipótesis. Durante la FMS se producen varios tipos de FAE teniendo que probablemente: a) Una de las enzimas FAE presenta ACIE y b) La CIE se produce al mismo tiempo que la FAE, que bajo las condiciones de cultivo ensayadas promovió que decreciera la ACIE. Esto debe ser corroborado.

Con el extracto enzimático producido por FMS bajo las condiciones de cultivo ensayadas se continuó a realizar la extracción enzimática del ACI esterificado a la pared celular de la PC. Se ajustó la APec, AXil y ACel de acuerdo a los intervalos determinados en el diseño de mezclas (U/g PC):  $60 \leq AXil \leq 150$ ,  $50 \leq APec \leq 140$ ,  $0 \leq ACel \leq 40$  para la extracción del ACI.

### 12.3.2 Extracción enzimática del ácido clorogénico con el extracto crudo producido por fermentación en medio sólido bajo las condiciones optimizadas

A partir del extracto enzimático producido por *R. pusillus* por FMS y bajo las condiciones de ensayo determinadas en el diseño factorial central compuesto se prosiguió a realizar la extracción enzimática del ACI presente en la PC. La PC fue pre-tratada con metanol al 80% para extraer el ACI libre. La extracción enzimática se realizó en la oscuridad, a 40°C, con agitación continua a 100 rpm por 8 h.

En la Tabla 12.8 se muestran los resultados de la extracción enzimática del ACI y los AH con el extracto enzimático producido por *R. pusillus* en FMS bajo las condiciones de medio de cultivo determinadas para tener la mayor APec y AXil y poca ACIE en comparación con las extracciones enzimáticas realizadas antes de la optimización.

**Tabla 12.8.** Extracción enzimática del ACI y los AH

Extractos enzimáticos	ACI (mg/kg)	AC (mg/kg)	AF (mg/kg)	ApC (mg/kg)
<b>E5</b> Extracto crudo de <i>R. pusillus</i> con producido bajo condiciones óptimas <sup>(a)</sup>	1646.8 ± 6.3	256.7 ± 2.1	8.7 ± 1.3	5.5 ± 0.9
<b>E1</b> Extracto crudo de <i>R. pusillus</i>	331 ± 5.7	19.2 ± 2.4	3.2 ± 2.4	5.2 ± 1.3
<b>E2</b> Extracto crudo de <i>R. pusillus</i> con 10 U de pectinasa comercial <sup>(b)</sup>	1296.24	43.99	16.43	5.67
<b>E3</b> Extracto crudo de <i>R. pusillus</i> y <i>Trametes</i> sp. con 10 U pectinasa comercial	1635.2 ± 5.2	101.3 ± 3.7	19.5 ± 2.8	10.6 ± 1.9
<b>E4</b> Preparación con 100 U pectinasa comercial y 100 U de xilanasa comercial <sup>(c)</sup>	1638.0 ± 20.5	80.5 ± 1.8	15.3 ± 0.5	0.5 ± 0.2

Los ensayos se realizaron por triplicado. Los extractos se produjeron por FMS.

(a) Optimización con diseño factorial central compuesto

(b) Torres-Mancera y col., 2011

(c) Diseño de mezclas

El extracto enzimático crudo producido por FMS por *R. pusillus* usando las condiciones de cultivo óptimas determinadas en el diseño central compuesto extrajo 69.1%

del ACI, 13.7% de AC, 10.5% de AF y 7% de ApC (E5). La cantidad de ACI total cuantificada por hidrólisis alcalina en la PC con respecto a la calculada a partir de la cantidad de ACI extraído y esterificado presentó una diferencia menor al 1%. Podemos advertir que el ACI extraído no fue hidrolizado a AC y AQ.

Los rendimientos de extracción del ACI y los AH por el extracto crudo de *R. pusillus* producido bajo las condiciones óptimas de cultivo definidas (E5) fueron mayores a los obtenidos al utilizar un extracto crudo de *R. pusillus* producido FMS usando 50% del medio de Asther y col. (E1) y el mismo extracto crudo de *R. pusillus* combinado con 10 U de pectinasa comercial (E2).

No se observaron diferencias significativas en el rendimiento de extracción del ACI al usar el extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido bajo las condiciones óptimas de cultivo definidas (E5), la mezcla de los extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. con 10 U de pectinasa comercial (E3) y la mezcla de 100 U de cada una de las enzimas pectinasa y xilanasas comerciales (E4). Es importante recalcar que el extracto crudo producido bajo las condiciones óptimas de cultivo (E5) presentó la misma eficiencia de extracción que la preparación con enzimas comerciales (E4).

El extracto producido bajo las condiciones óptimas de cultivo (E5) extrajo 2.5 y 3.2 veces más AC que la mezcla de los extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. con 10 U de pectinasa comercial (E3) y la mezcla de 100 U de cada una de las enzimas pectinasa y xilanasas comerciales (E4), respectivamente.

La mezcla de los extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. con 10 U de pectinasa comercial (E3) extrajo 2.2 y 1.9 veces más AF y ApC que el extracto producido bajo las condiciones óptimas de cultivo determinadas (E5).

Las diferencias de la extracción de los AH por los distintos extractos puede deberse a la presencia de las enzimas FAE y otras esterasas producidas. Además, de la posible transformación de los AH en otros compuestos.

Con respecto a las enzimas FAE se tiene que la Tipo A puede liberar una mayor proporción de ácido sinápico (AS), AF y ApC. La Tipo B extrae una mayor proporción de AF, AC y ApC. Las Tipo C y D pueden liberar una mayor proporción de AF, AS, ApC y AC, la diferencia es que la Tipo D puede liberar el ácido diferúlicos 5-5' (Crepin y col., 2004).

Para el caso de la transformación se tiene que el AC por acción de la enzima cafeato-*O*-metiltransferasa puede ser transformado a AF. El AF puede ser transformado a 4-vinil guaiacol por *Saccharomyces delbrueckii* y en 2-methoxy-4-vinil fenol por *Saccharomyces cerevisiae* y *Pseudomonas fluorescens* (Huang y col., 1993). El ApC puede ser transformado a AC por bacterias como *Streptomyces griseus* y hongos filamentosos como *Gliocladium deliquescens* (Torres y Torres y Rosazza, 2001).

Los resultados muestran el potencial para extraer ACI de la PC a partir de extractos enzimáticos crudos producidos por FMS. Los extractos enzimáticos crudos no representan un costo elevado en su producción y la manera de obtenerlos es relativamente fácil.

#### **12.4 CONCLUSIONES DE LA OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO CRUDO Y DE LA EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA DEL ÁCIDO CLOROGÉNICO**

A partir del diseño experimental tipo Plackett-Burman se determinó que la APec, AXil y ACel medida en los extractos enzimáticos de *R. pusillus* producidos por FMS fueron afectadas por la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y temperatura. Mientras que la actividad de la CIE fue sólo afectada por la concentración de sacarosa, maltosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ .

Se observaron efectos contrarios con relación a la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en la ACIE y la APec, AXil y ACel.

Con el diseño factorial central compuesto se determinó que los intervalos donde se presentó la zona de mayor producción de las APec y AXil son (g/100 g SS):  $4.9 \leq \text{Sacarosa} \leq 6$ ,  $2 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 3.6$ ,  $2.1 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 3.2$  y los intervalos donde se presentó la

zona de menor ACIE son (g/100 g SS):  $5.4 \leq \text{Sacarosa} \leq 7.5$ ,  $2.5 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 4.5$ ,  $1.9 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 4.5$ .

El extracto enzimático crudo producido por FMS por *R. pusillus* usando las condiciones de cultivo óptimas presentó una eficiencia de extracción del ACI del 69.1%. Esta eficiencia no presentó diferencias significativas a la obtenida con las enzimas comerciales pectinasa y xilanasas y además fue mayor a la obtenida en las demás extracciones realizadas a lo largo del trabajo experimental desarrollado. Lo cual resultó interesante porque muestran el potencial para extraer ACI de la PC a partir de extractos enzimáticos crudos producidos por FMS.

### 13 DISCUSIÓN GENERAL

Se estableció una metodología para la cuantificación de la APec, AXil y ACel en cajas de Petri basado en la formación de halos de aclaramiento. Se determinó que el ensayo puede ser utilizado para evaluar de manera cuantitativa la actividad de enzimas despolimerizantes ya que hay una correlación lineal entre el área del halo de hidrólisis y la concentración de enzima comercial (U/caja).

Los geles son considerados materiales semi-sólidos porosos. La difusión en geles como el agar es un proceso irreversible en el cual las moléculas que se encuentran en un punto se transfieren o desplazan a través de un medio donde las moléculas en un inicio estaban ausentes, aumentando la entropía del sistema (Geankoplis, 1999). La difusión en agar se vió afectada por la concentración de enzima utilizada, el tamaño y tipo de enzima comercial, la concentración del sustrato y la temperatura. En la literatura se encuentran algunos reportes con metodologías similares como es el caso de Akinrefon y col. (1968) y Montville y col. (1983) que reportan la actividad de la poligalacturonasa y proteasa de manera cuantitativa en cajas de Petri.

En el caso de la técnica para medir la ACIE por espectrofotometría se comprobó que a partir de la ecuación de Lambert y Beer por la estimación de los coeficientes de extinción molar del ACI y AC se puede determinar con precisión las concentraciones de los mismos en el medio de reacción. Se observó que el ACI y AC presentaron espectros de absorción característicos que pueden ser utilizados para su identificación en concentraciones mínimas de hasta 0.018 mM y que no cambian en un rango de pH de 4 a 6.

El coeficiente de correlación de Pearson fue de 0.999 entre las concentraciones de ACI y AC estimadas y de la solución problema. Entre más se acerque el valor del coeficiente de correlación a 1 mayor será la correlación entre los datos de las matrices (Box y col., 2008).

El análisis en línea de la respirometría se llevó a cabo mediante la medición de la concentración de CO<sub>2</sub> (%) producido, O<sub>2</sub> (%) consumido y el flujo de la corriente a analizar. Al comparar las mediciones realizadas con el sistema de respirómetro desarrollado

y por cromatografía de gases se observó que presentaron perfiles de concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> similares y coeficientes de correlación mayores a 0.9. Por lo que el sistema de respirómetro pudo determinar de manera adecuada la evolución del cultivo en medio sólido proporcionando datos de buena calidad.

El sistema de respirometría desarrollado presenta las siguientes ventajas con respecto a los sistemas antes reportados:

- a) La capacidad de realizar mediciones en varios canales (puertos o unidades experimentales) independientes por lo que existe la posibilidad de tener controles y repeticiones experimentales.
- b) La capacidad de medir el flujo másico (std cm<sup>3</sup> ml/min) y registrarlo en el tiempo para cada una de las corrientes de salida o unidades experimentales el cual es indispensable al momento de realizar los balances de materia.
- c) En comparación con los sistemas que usan cromatografía de gases, este equipo no necesita de He como gas acarreador, lo que disminuye el gasto de insumos.
- d) El tiempo de análisis en el flujo más bajo ensayado (20 ml/min) no excede los 7 min de muestreo.
- e) Cada una de las válvulas es independiente por lo que permite mantener abiertas las válvulas o canales que sólo se vayan a analizar, manteniendo cerrados todos los canales que no se usen. Se puede modificar la secuencia de muestreo, permitiendo trabajar en serie o en paralelo.
- f) La adquisición de datos se hace de manera fácil y conjunta a través de una hoja de Excel donde se concentra la siguiente información: día, hora, concentración de CO<sub>2</sub> (%), concentración de O<sub>2</sub> (%), flujo (ml/min) y número de válvula.
- g) Tiene la capacidad de aumentar su capacidad de análisis y control al conectar otros detectores como por ejemplo para determinar contenido de agua en fase gaseosa y dentro de sólidos, pH, temperatura, CH<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>.
- h) El monitoreo y administración del sistema se puede hacer remotamente desde cualquier parte del mundo vía internet.

Los perfiles de producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub>, se analizaron utilizando los modelos de crecimiento Logístico y de Gompertz. Se determinó que la suma del cuadrado del error fue menor para el modelo de Gompertz y además presentó una  $R^2 > 0.9$  para los datos experimentales obtenidos en todos los cultivos en medio sólido utilizando residuos agro-industriales. Es decir, el modelo de crecimiento de Gompertz presentó un mejor ajuste con los datos experimentales.

Teniendo las técnicas y equipos necesarios para realizar el trabajo experimental se comenzó con la pre-selección de las cepas. Los criterios para pre-seleccionar las cepas fueron que presentaran los mayores IP en cajas Petri con 2 g/L de PC, PCT, pectina, xilano y CM-celulosa, los menores IP en cajas Petri con 0.5 g/L de ACI y la menor capacidad de hidrolizar en tubos de ensaye el ACI en una concentración de 0.1 g/L. Las cepas de *Aspergillus* hidrolizaron más del 90% del ACI en AC, AQ y otros compuestos como el AP. Por lo que no fueron buenas candidatas para seguir siendo utilizadas. Las cepas pre-seleccionadas fueron *A. tamaraii*, *R. pusillus* y *Trametes* sp.

Los criterios para la selección de las cepas fueron que los extractos enzimáticos producidos por FMS fueran capaces de extraer el ACI sin hidrolizarlo usando PC como soporte/sustrato. Se observó en los extractos enzimáticos que los perfiles de producción de la FAE y CIE fueron similares lo que hace suponer que se trataba de la misma enzima lo cual ya ha sido reportado con anterioridad (Faulds, 2010).

El extracto crudo de *A. tamaraii* producido por fermentación en matraces y en columnas presentó la mayor actividad de las enzimas pectinasa y FAE. En la fermentación en columnas *A. tamaraii* presentó la mayor ACIE. En la fermentación en matraces el extracto crudo de *Trametes* sp. presentó la mayor ACIE.

Además se observó un aumento en las actividades de la FAE y CIE expresadas en los extractos crudos producidos por fermentación en columnas en comparación con los extractos crudos producidos por fermentación en matraces.

Para el caso del aumento de la actividad FAE se debió a la maltosa utilizada como fuente de carbono inductor (Asther y col., 2002), a que hay una mejor remoción de calor

metabólico y un mejor intercambio gaseoso en la fermentación en columnas que en la fermentación en matraces.

La actividad de la FAE de los 3 extractos crudos fue mayor a la reportada por Asther y col. (2002) y Ramírez y col. (2008) donde se utilizó pulpa de remolacha azucarera y pulpa de café como inductores respectivamente. Sin embargo, fue menor a la reportada por Hegde y col. (2006) donde utilizó salvado de trigo como inductor. Por otro lado, la actividad FAE reportada por Bartolomé y col. (1997) donde se utilizó trigo como inductor fue similar a la actividad FAE de *R. pusillus*. Estas diferencias se debieron no sólo al tipo de inductor utilizado si no también a la composición del medio de cultivo empleado en cada caso.

Para el caso donde aumentó la ACIE se observó que en los extractos producidos por fermentación en matraces, *Trametes* sp. presentó la mayor ACIE mientras que en los extractos producidos por fermentación en columnas *A. tamaritii* presentó la mayor ACIE. Es probable que algunas cepas produzcan enzimas FAE que presenten la ACIE tal es el caso de la FAE tipo C (Crepin y col., 2004; Faulds, 2010), mientras que otras cepas producen dos enzimas una con actividad FAE y otra con ACIE, como lo reporta Asther y col. (2005). Ellos mencionaron que la CIE y la FAE son dos enzimas diferentes debido a que en extractos enzimáticos producidos por *A. niger* en bagazo de caña determinaron que la FAE tipo B no presentó ACIE y la enzima CIE no presentó actividad FAE.

Para realizar la extracción enzimática del ACI se estudio la temperatura y periodo de incubación. Se determinó que las condiciones de extracción enzimática del ACI serían 40°C por 8 h a 100 rpm. Los extractos enzimáticos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. extrajeron aproximadamente 17% del ACI esterificado a la pared celular de la PC. *Trametes* sp. presentó la más alta ACIE (0.49 U/g MS) además, hidrolizó 2.1 y 2 veces más ACI presente en la PC en las fermentaciones en matraces y en columnas que *R. pusillus*, esto por la presencia de la enzima CIE.

Por lo tanto, se decidió seleccionar únicamente a *R. pusillus* ya que fue la cepa cuyo extracto enzimático extrajo la mayor cantidad de ACI sin hidrolizarlo con respecto a las otras cepas pre-seleccionadas.

A partir de realizar las mezclas de los extractos obtenidos por FMS de las 3 cepas pre-seleccionadas y agregando pectinasa comercial se determinó que la presencia de enzimas despolimerizantes, como la pectinasa, era necesaria para obtener altos rendimientos en la extracción del ACI (68%). Las enzimas despolimerizantes degradan la pared celular de la PC facilitando la acción de enzimas que hidrolizan el enlace éster entre el ACI y los monosacáridos presentes en la pared celular.

El rendimiento de extracción del ACI obtenido con la mezclas de las extractos crudos y la pectinasa comercial fue 1.3 veces mayor al obtenido en un trabajo previo (Torres-Mancera y col., 2011). Las diferencias entre las extracciones enzimáticas del ACI y AH sugieren que cada extracto crudo presentó diferentes enzimas debido a que cada microorganismo presenta diferentes sistemas de inducción y represión de las enzimas. Este aspecto podría ser estudiado más adelante.

Debido a los bajos rendimientos de extracción de ACI obtenidos con el extracto crudo de *R. pusillus* (17%) producido por fermentación en columnas usando PC como soporte/sustrato y medio de Asther y col. (2002) diluido al 50%, y considerando la posibilidad de que la presencia de la pectinasa comercial favorecía la extracción del ACI, se prosiguió a determinar mediante un diseño de mezclas el efecto de las actividades enzimáticas despolimerizantes sobre la extracción del ACI esterificado a la PC.

Con ayuda del diseño de mezclas se determinó que la presencia de las APec y AXil tuvieron un efecto positivo importante en la extracción del ACI opuesto a la presencia de la ACel. Los intervalos de concentraciones (U/g PC) donde se presentó la zona de máxima extracción de ACI esterificado para las 3 enzimas fue:  $60 \leq AXil \leq 150$ ,  $50 \leq APec \leq 140$ ,  $0 \leq ACel \leq 40$ .

El rendimiento obtenido con las 2 enzimas comerciales (69%) fue similar al obtenido con las mezclas de los extractos enzimáticos crudos de *R. pusillus* y *Trametes* sp. producidos por fermentación en columnas durante la selección de las cepas y la pectinasa comercial (68%). Lo que muestra el potencial de usar extractos enzimáticos crudos para extraer compuestos de alto valor agregado como el ACI.

Por otra parte, la presencia de las APec, AXil y ACel tuvieron un efecto positivo importante en la extracción de los AH. Sin embargo, los mayores rendimientos de extracción para los AH hasta el momento obtenidos fueron para los extractos crudos de *A. tamarii*, *R. pusillus* y *Trametes* sp. Es probable que las diferencias se deban a la presencia de la enzima FAE la cual es responsable de hidrolizar el enlace éster entre los AH y los monosacáridos de la pared celular de la PC.

Después de determinar el efecto de las enzimas despolimerizantes sobre la extracción del ACl se prosiguió a establecer las condiciones de cultivo óptimas del cultivo sólido de *R. pusillus* que promovieran la producción de enzimas despolimerizantes necesarias para extraer el ACl presente en la PC sin hidrolizarlo. Esto se realizó con ayuda del diseño experimental tipo Plackett-Burman y el diseño factorial central compuesto.

El diseño experimental tipo Plackett-Burman con 8 corridas y 7 factores resultó ser una herramienta estadística útil y valiosa que nos permitió determinar, con un número reducido de ensayos los factores que tienen un efecto sobre la expresión de la APec, AXil, ACel y ACIE, lo cual corresponde a un ensayo multirespuesta.

La concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y la temperatura tuvieron un efecto positivo sobre la APec y la AXil. Por el contrario la concentración de sacarosa,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  tuvieron un efecto negativo sobre la ACIE. Este fenómeno resultó ser muy favorable debido a que uno de las prioridades del presente trabajo era que el extracto crudo no presentara la ACIE, que es la responsable de hidrolizar el ACl a AC y AQ.

El extracto del ensayo M8 producido por FMS con los niveles máximos de los 7 factores estudiados del diseño experimental tipo Plackett-Burman, presentó las mayores APec (35 U/g MS), AXil (19.2 U/g MS) y ACel (3.6 U/g MS) en comparación con los demás ensayos pero además presentó la mayor ACIE (0.2 U/g MS) lo cual se reflejaría en pérdidas del ACl extraído por hidrólisis del mismo. Por otro lado el extracto del ensayo M6 producido por FMS con los niveles mínimos de los factores concentración de maltosa y de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , temperatura y tamaño de partícula, presentó la más baja ACIE (0.1 U/g MS) y menor APec (21.7 U/g MS) y AXil (15.4 U/g MS) en comparación con el extracto del

ensayo M8. La menor APec (4.6 U/g MS), AXil (9.8 U/g MS) y ACel (1.2 U/g MS) coincidió con la menor producción de CO<sub>2</sub> observado en el ensayo M3. Este ensayo presentó los niveles mínimos de los factores de concentración de sacarosa y de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, solución de oligoelementos y temperatura.

En la etapa de selección de las cepas se observó en las fermentaciones en matraces y en columnas que el uso de la maltosa como fuente de carbono tenía un efecto positivo en la inducción de la ACIE. De esta misma manera, Asther y col. (2005) utilizan a la maltosa para inducir la producción de la enzima CIE por cepas de *A. niger* usando pulpa de remolacha azucarera como soporte/sustrato. Esto explicaría porque el extracto del ensayo M6 presenta la más baja ACIE y el extracto del ensayo M8 la más alta ACIE.

La APec y AXil son afectadas por la temperatura de incubación, el ensayo M8 se realizó a 40°C y los ensayos M3 y M6 fueron a 30°C. *R. pusillus* esporula mejor a 30°C, por lo que en muchos trabajos publicados la producción de inóculo se lleva a cabo a esta temperatura (Christov y col., 1999). Mientras que la mayor abundancia del micelio se presenta a 40°C. Por otro lado, Acuña-Arguelles y col. (1995) observaron que la producción de una enzima endo-pectinasa de *A. niger* se ve afectada por la temperatura de incubación a temperaturas mayores a 60°C se tiene una menor actividad que a 50°C.

Las diferencias de las APec y AXil de los ensayos M3, M6 y M8 pueden deberse a las concentraciones de carbono y fuentes de nitrógeno ensayadas.

Solís-Pereira y col. (1993) determinaron que la concentración de ácido galacturónico, de sacarosa y de glucosa tiene un efecto positivo en la producción de pectinasas por *A. niger*. Patil y Dayanand (2006) observaron que las actividades endo- y exo-pectinasa aumentaron entre un 20% y 50% al usar sacarosa como fuente de carbono que glucosa como fuente de carbono en las FMS con residuos de girasol de las cepas de *A. niger* DMF27 y DMF45. Estas mismas actividades enzimáticas también aumentaron un 10% al usar (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fuente de nitrógeno que (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en las FMS de las cepas de *A. niger* DMF27 y DMF45 (Patil y Dayanand, 2006; Galiotou-Panayotou y Kapantai, 1993; Aguilar y Huitron, 1990).

Rifaat y col. (2005) observaron que la mayor AXil se presenta al usar xilano como fuente de carbono seguido de celulosa>dextrina>sacarosa>maltosa>xilosa>glucosa. Con respecto a las fuentes de nitrógeno  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  no se observaron diferencias significativas al producir las xilanasas por *Streptomyces* sp. en pasta de paja de arroz.

Las actividades despolimerizantes de los extractos del ensayo M8 y M6 se encontraron por debajo del intervalo establecido por el diseño de mezclas para tener la máxima extracción el ACI presente en la PC. Las APec y AXil del ensayo M8 fueron menores a lo reportado por Bai y col. (1680 U/ g MS) para un extracto con APec de *A. niger* producido por FMS usando remolacha azucarera y por Maciel y col. (190 U/g MS) para un extracto con AXil de *A. niger* producido por FMS usando una mezcla de bagazo de caña y harina de soya respectivamente.

Los perfiles de actividad enzimática APec, AXil, ACel y ACIE, determinados para los 8 ensayos del diseño experimental tipo Plackett-Burman mostraron que el momento en el que se obtiene el extracto enzimático de *R. pusillus* resultó ser un factor relevante debido a que la ACIE se presentó entre 2 y 4 horas después de tener la máxima APec, AXil y ACel, por lo que obtener el extracto cuando se tiene la máxima actividad despolimerizante también nos asegura que se tendrá presente una baja ACIE.

Con el diseño factorial central compuesto se determinaron las condiciones óptimas de cultivo de concentración de sacarosa, de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  para tener la mayor APec, AXil y ACel y la menor ACIE simultáneamente en el extracto crudo producido por FMS que extraerá el ACI presente en la PC. Este diseño resultó también del tipo multirespuesta.

En las condiciones ensayadas en el diseño factorial central compuesto se observó un posible efecto de represión catabólica sobre las APec y AXil a concentraciones de sacarosa mayores a 6 g/100 g.

La represión del sistema xilanolítico puede darse por la presencia de fuentes de carbono de bajo peso molecular como xilosa, arabinosa y xilobiosa (Vries y col., 2002). Rawashdeh y col. (2005) observaron que cuando la glucosa se utiliza como fuente de

carbono en comparación con otras fuentes de carbono como el xilano se pierde hasta un 67% de la AXil en cepas de *Streptomyces* sp. utilizando orujo de tomate, lo que sugiere un efecto de la represión catabólica por glucosa.

La L-arabinosa, L-ramnosa y ácido ferúlico provocan la expresión de sub-series de genes pectinolíticos. Los principales represores de los sistemas pectinolíticos son las fuentes de carbono fácilmente metabolizables como glucosa, fructosa y sacarosa (Vries, 2003).

Los efectos normalizados de las APec y AXil permitieron determinar que los intervalos donde se presentó la zona de mayor actividad para ambas enzimas fueron (g/100 g SS):  $5 \leq \text{Sacarosa} \leq 6$ ,  $2 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 3.3$  y  $2.1 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 2.9$ . Con estas condiciones se continuó a obtener el extracto enzimático crudo por FMS y realizar la extracción del ACI esterificado a la pared celular de la PC.

La ACIE fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración de sacarosa, lo cual es congruente con los resultados obtenidos en el diseño experimental tipo Plackett-Burman. Los intervalos de concentración donde se presentó la zona de menor ACIE fueron (g/100 g SS):  $5.4 \leq \text{Sacarosa} \leq 7.5$ ,  $2.5 \leq (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \leq 4$ ,  $2.5 \leq (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \leq 4$ . Estos intervalos se encontraron dentro del intervalo donde se obtuvo las mayores APec y AXil.

El extracto enzimático crudo de *R. pusillus* producido por FMS se produjo en las siguientes condiciones de cultivo (g/100 g SS): Sacarosa, 5.5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2.8 y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 2.6. Estas condiciones se encontraron dentro de los intervalos de concentraciones de sacarosa y fuente de nitrógeno optimizadas en el diseño factorial central compuesto. Con el extracto enzimático crudo (67.7 U APec/g MS, 36.8 U AXil/g MS, 10.5 U ACel/g MS y 0.1 U ACIE/g MS) se prosiguió a realizar la extracción del ACI presente en la PC, ajustando las APec, AXil y ACel a los intervalos determinados en el diseño de mezclas para obtener la máxima extracción del ACI.

El rendimiento de extracción del ACI con el extracto crudo obtenido con las condiciones óptimas fue de 69%. Este rendimiento fue similar al obtenido con las dos enzimas comerciales pectinasa y xilanasa y las mezclas de los extractos crudos de *R.*

*pusillus* y *Trametes* sp. con la pectinasa comercial. Estas similitudes se debieron probablemente a que las actividades enzimáticas despolimerizantes presentes en los ensayos se encontraron en la zona de máxima extracción del ACI determinada en el diseño de mezclas. Es importante destacar, que la metodología para la producción de los extractos crudos enzimáticos para la extracción de compuestos con alto valor agregado como el ACI fue muy sencilla de llevar a cabo.

Este trabajo mostró el potencial de extraer compuestos de alto valor agregado como el ácido clorogénico esterificado a la pared celular de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos crudos producidos por FMS.

## 14 CONCLUSIONES

El ensayo de cuantificación de la APec, AXil y ACel en cajas de Petri resultó ser una técnica simple de llevar a cabo, la cual permitió determinar de manera cualitativa la presencia de las actividades por la presencia del halo de hidrólisis y de manera cuantitativa las actividades mediante las correlaciones con curvas estándar.

La técnica para medir indirectamente la ACIE por espectrofotometría resultó ser sencilla, precisa y reproducible para medir las concentraciones de ACI y de AC producto de la hidrólisis.

El sistema de respirómetro desarrollado determinó de manera adecuada la evolución del cultivo en medio sólido proporcionando datos de buena calidad para estudios adicionales. El modelo de Gompertz presentó los mejores resultados en cuanto al ajuste con los datos experimentales, esta puede ser una metodología útil para profundizar en los estudios cinéticos de FMS.

*A. tamarii*, *R. pusillus* y *Trametes* sp. fueron pre-seleccionadas porque presentaron los mayores valores del IP en las cajas Petri con PC, PCT, pectina, xilano y CM-celulosa en comparación con las demás cepas. Además, *R. pusillus* presentó el menor IP en cajas de Petri con ACI y la menor capacidad de hidrolizar el ACI en los tubos de ensayo en comparación con las demás cepas ensayadas.

*R. pusillus* fue seleccionada porque su extracto enzimático extrajo la mayor cantidad de ACI (17%) sin hidrolizarlo con respecto a las demás cepas ensayadas. Además, las enzimas FAE y CIE producidas en la fermentación en matraces presentaron perfiles de actividad enzimática similares. Las actividades enzimáticas de ambas enzimas aumentaron en la fermentación en columnas al utilizar el medio de Asther y col. (2002) al 50%. Esto ocasionó un incremento entre el 20 y 40% de la transformación del ACI en la PCF.

El diseño de mezclas simplex centroide mostró que la presencia de las APec y AXil tuvieron un efecto positivo importante en la extracción del ACI. Los intervalos de

---

concentraciones (U/g PC) donde se presentó la zona de máxima extracción de ACI esterificado fue:  $60 \leq AXil \leq 150$ ,  $50 \leq APec \leq 140$ ,  $0 \leq ACel \leq 40$ .

El diseño experimental tipo Plackett-Burman fue una herramienta estadística valiosa que nos permitió determinar con pocos ensayos (8) el efecto de 7 factores sobre las APec, AXil, ACel y ACIE.

La APec, AXil y ACel medida en los extractos enzimáticos de *R. pusillus* producidos por FMS fueron afectadas positivamente por la concentración de sacarosa,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $(NH_4)_2HPO_4$  y temperatura. Mientras que la actividad de la CIE fue sólo afectada negativamente por la concentración de sacarosa,  $(NH_4)_2SO_4$  y  $(NH_4)_2HPO_4$ .

Se observaron efectos contrarios con relación a la concentración de sacarosa,  $(NH_4)_2SO_4$  y  $(NH_4)_2HPO_4$  entre la ACIE y las APec, AXil y ACel.

El momento en que se obtiene el extracto enzimático de *R. pusillus* resultó ser un factor favorable debido a que la ACIE se presentó entre 2 y 4 horas después de presentarse la máxima APec, AXil y ACel.

El diseño factorial central compuesto permitió determinar los intervalos donde se presentó la zona de mayor APec y AXil (g/100 g SS):  $4.9 \leq \text{Sacarosa} \leq 6$ ,  $2 \leq (NH_4)_2SO_4 \leq 3.6$ ,  $2.1 \leq (NH_4)_2HPO_4 \leq 3.2$  y los intervalos donde se presentó la zona de menor ACIE (g/100 g SS):  $5.4 \leq \text{Sacarosa} \leq 7.5$ ,  $2.5 \leq (NH_4)_2SO_4 \leq 4.5$ ,  $1.9 \leq (NH_4)_2HPO_4 \leq 4.5$ .

El extracto enzimático crudo producido por FMS por *R. pusillus* usando las condiciones de cultivo óptimas presentó una eficiencia de extracción del ACI de 69.1%. Esta eficiencia no presentó diferencias significativas a la obtenida con las enzimas comerciales pectinasa y xilanasas y además fue mayor a la obtenida en las demás extracciones realizadas a lo largo del trabajo experimental desarrollado.

Este trabajo mostró el potencial de extraer compuestos de alto valor agregado como el ácido clorogénico esterificado a la pared celular de la pulpa de café a partir de extractos enzimáticos crudos producidos por FMS.

## 15 PERSPECTIVAS

Seguir estudiando de manera más detallada como el ACI es liberado de la pared celular de la PC por las enzimas despolimerizantes con la finalidad de entender mejor este mecanismo.

Estudiar la inducción e inhibición de la enzima CIE, ya que esta enzima es la responsable de que se hidrolice el ACI, ocasionando pérdidas en la extracción.

En este trabajo se observó que la enzima FAE puede presentar ACIE. Sin embargo, es necesario verificar si se trata de la misma enzima o de enzimas diferentes. Además de determinar si la enzima CIE puede presentar actividad FAE.

El uso de una mezcla de 3 diferentes soportes agroindustriales ayudó a inducir la producción de diferentes enzimas despolimerizantes. Es importante estudiar el efecto de variar la proporción en una mezcla de los soportes con respecto a la producción de las enzimas despolimerizantes.

Este trabajo muestra el potencial de usar extractos enzimáticos crudos producidos por FMS para la obtención de compuestos con alto valor agregado de la PC como es el caso del ACI.

La estrategia y metodología empleada en este trabajo puede aplicarse a otros residuos y posteriormente recurrir a otros bioprocesos como la digestión anaerobia o el composteo para producir biocombustibles y al mismo tiempo evitar un problema ambiental.

---

**16 REFERENCIAS**

- 1 [www.thecoffeeguide.org](http://www.thecoffeeguide.org)
- 2 [www.lookfortherapy.com/mesh\\_info.php?term=%C3%81cido+Clorog%C3%A9nico&lang=2](http://www.lookfortherapy.com/mesh_info.php?term=%C3%81cido+Clorog%C3%A9nico&lang=2)
- 3 [www.spanish.alibaba.com](http://www.spanish.alibaba.com)
- 4 Abdullah Y., Schneider B., Petersen M. (2008). Occurrence of rosmarinic acid, chlorogenic acid and rutin in Maranteceae species. *Phytochem. Letters*. **1**:199-203.
- 5 Acosta I.R. de, Márquez-Araque A., Huerfano T., Chanchón I. (1997). Evaluación de pulpa de café en aves: Digestión y energía metabolizable. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* **5**:311-312.
- 6 Acuña-Argüelles M.E., Guitiérrez-Rojas M., Viniegra-González G., Favela-Torres E. (1995). Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:808-814.
- 7 Acke L.W. (1969). Water activity and enzyme activity. *Food Technol.* **23**:1257-1270.
- 8 Adachi O., Ano Y., Akakabe Y., Shinagawa E., Matsushita K. (2008). Coffee pulp *koji* of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**:143-151.
- 9 Adams M., Ghaly A.E. (2007). Maximizing sustainability of the Costa Rica coffee industry. *J. Celaner Prod.* **15**:1716-1729.
- 10 Aguilar C.N., Guitérrez-Sánchez G., Prado-Barragán L.A., Rodríguez-Herrera R., Martínez-Hernández J.L., Contreras-Esquivel J.C. (2008). Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **4**:354-366.
- 11 Aguilar G., Huitron C. (1990). Constitutive exo pectinasa produced by *Aspergillus* sp. CH-Y-1043 on different carbon source. *Biotechnol. Lett.* **12**:655-660.
- 12 Aiello C., Ferrer A., Ledesma A. (1996). Effect of alkaline treatments at various temperatures on cellulose and biomass production using submerged surcane bagasse fermentation with *Trichoderma reesei* QM 9414. *Biores. Technol.* **57**:13-16.
- 13 Aliwan F.O., Kroon P.A., Faulds C.B., Pickersgill R., Williamson G. (1999). Ferulic acid esterase-II from *Aspergillus niger* does not exhibit lipase activity. *J. Sci Food Agric.* **79**:457-459.
- 14 Antier P., Minjares A.S., Roussos M., Viniegra G.G. (1993). Pectinase-hyperproducing mutants of *Arpergillus niger* C28B25. For solid-state fermentation of coffee pulp. *Enzyme Microb. Technol.* **15**:254-260.

- 15 Allerdings E., Ralph J., Schatz P.F., Gniechwitz D., Steinhart H., Bunzel M. (2004). Isolation and structural identification of diarabinosyl 8-O-4-dehydrodiferulate from maize bran insoluble fibre. *Phytochem.* **66**:113-124.
- 16 Allerdings E., Ralph E., Steinhart H., Bunzel M. (2006). Isolation and structural identification of complex feruloylated heteroxylan side-chain from maize bran. *Phytochem.* **67**:1276-1286.
- 17 Aranda D. E. (1988). La utilización de lombrices en la transformación de la pulpa de café en abono orgánico. *Acta Zool. Mex.* pp 21-23
- 18 Arellano-Gómez L.A., Saucedo-Veloz C., Arévalo-Galarza L. (2005). Biochemical and physiological changes during ripening of black zapote fruit (*Diospyros digyna*). *Agrociencia.* **39**:173-181.
- 19 Asther M., Haon M., Roussos S., Record E., Delattre M., Lesege-Meessen L., Asther M. (2002). Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* **38**:685-691.
- 20 Asther M., Estrada-Alvarado M., Haon M., Navarro D., Asther M., Lesage-Meessen L., Record E. (2005). Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalyzing the hydrolysis of chlorogenic acid. *J. Biotechnol.* **115**:47-56.
- 21 Auerbach R.H., Gray D.A. (1999). Oat antioxidant extraction and measurement towards a commercial process. *J. Sci. Food Agric.* **79**:385-389.
- 22 Azevedo A. B. A., Mazzafera P., Mohamed R. S., Vieira de Melo S. A. B. and Kieckbusch T. G. (2008). Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Braz. J. of Chem. Eng.* **25**:543-552.
- 23 Bai Z.H., Zhang H.X., Qi H.Y., Peng X.W., Li B. J. (2004). Pectinase production by *Aspergillus niger* using wastewater in solid state fermentation for eliciting plant disease resistance. *Bioresource Technol.* **95**:49-52.
- 24 Baqueiro-Peña I., Rodríguez-Serrano G., González-Zamora E., Augur C., Loera O., Saucedo-Castañeda G. (2010). Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.* **101**:4721-4724.
- 25 Baldensperger J., Mer J., Hannibal L., Quinto P.J. (1985). Solid state fermentation of banana wastes. *Biotechnol. Lettrs.* **7**:743-748.
- 26 Bartolomé B., Faulds C., Kroon P., Waldron K., Gilberto H., Hazlewood G., Williamson G. (1997). An *Aspergillus niger* esterase (Ferulic Acid Esterase III) and recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Cellulose* esterase (XylD) release 5-5'ferulic dehydromer (diferulic acid) from barley and wheat cell wall. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:208-212.

- 
- 27 Belitz y Grosh (1997). Química de los Alimentos. Café, té y cacao. 2a ed., España. pp 1011-1021.
- 28 Benoit I., Navarro D., Marnet N., Rakotomanomana N., Lesage-Meessen L., Sigoillot J. C., Asther M., Asther M. (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compound from agro-industrial by-products. *Carbohydr. Res.* **341**:1820-1827.
- 29 Benoit I., Asther M., Bourne Y., Navarro D., Canaan S., Lesage-Meessen L., Herweijer M., Coutinho P.M., Asther M., Record E. (2007). Gene Overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**:5624-5632.
- 30 Borneman W.S., Hartley R.D., Himmelsbach D.S., Ljungdahl L.G. (1990). Assay for trans-pcoumaroyl esterase using a specific substrate from plant cell walls. *Analytical Biochem.* **190**:129-133.
- 31 Brand D., Pandey A., Roussos S., Socol R.C. (2000). Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme Microbial. Technol.* **27**: 127-133.
- 32 Bressani, R., Braham, J. (1980). Utilization of coffee pulp as animal feed. In: *Association Scientifique Internationale du Café. ASIC, Ninth Colloquium on Coffee*, London. pp. 303-323.
- 33 Bushman B.S., Snook E.M., Gerke P.J., Szalma S.J., Berhow A.M., Houchins E.K., McMullen D.M. (2002). Two loci exert major effects on chlorogenic acid synthesis in maize silks. *Crop. Sci.* **42**:1669-1678.
- 34 Cannel E., Moo-Young M. (1980). Solid-state fermentation systems. *Process Biochem.* **15**:2-7.
- 35 Carbomell A., Vilanova M. (1974). Beneficiado rápido y eficiente del café mediante el uso de soda cáustica. En: Cleves, R. Justificación de un proyecto para investigar la obtención de pectina a partir del mucílago del café. Departamento de Estudios Técnicos y Diversificación. Proyecto 1. Subproyecto 5. Oficina del Café, San José, Costa Rica.
- 36 Carvalho J.C., Pandey A., Oishi B.O., Brand D., Rodríguez-León J.A., Socol C.R. (2006). Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **29**:262-269.
- 37 Castanares A., McCrae S.I., Wood T.M. (1992). Purification and properties of a feruloylpcoumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. *Enzyme Microb. Technol.* **14**:875-884.
- 38 Chadha B.S., Gulati H., Minhas M., Saini H.S., Singh N. (2004). Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**:105-109.

- 
- 39 Channe P.S., Shewale J.G. (1995). Pectinase production by *Sclerotium rolfsii*: Effect of culture conditions. *Folia Microbiol.* **40**:111-117.
- 40 Chen Y., Qiming J.Y., Xuemei L., Yaojun L. Hui L. (2007). Extraction and HPLC characterization of chlorogenic acid from tobacco residuals. *Jiangsu. Agr. Sci.* **1**:92-94.
- 41 Cheetham P.S.J., Gradley M.L. (2003). Ferulic acid ethyl-guaiacol or vinyl guaiacol as preservative combination in cosmetic compositions. U.S. Patent Documents, Patent Number 0176508 A1.
- 42 Christensen L.H. Schulze U., Nielsen J., Villadsen J. (1995). Acoustic off-gas analyser for bioreactors: precision, accuracy and dynamics of detection. *Chem. Eng. Sci.* **50**:2601-2610.
- 43 Christov L.P., van Driessel B., du Plessis C.A. (1999). Fungal biomass from *Rhizomucor pusillus* as adsorbent of chromophores from a bleach plant effluent. *Process Biochem.* **35**:91-95.
- 44 Clifford M.N. (1985). Coffee bean dicaffeoylquinic acid. *Phytochem.* **25**:1767-1769.
- 45 Clifford M.N. (1999). Chlorogenic acid and other cinnamates-nature occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* **79**:362-372.
- 46 Clifford M.N., Knight S. (2004). The cinnamoyl-amino acid conjugates of green robusta coffee beans. *Food Chem.* **87**:457-463.
- 47 Colquhoun I.J., Ralet M.C., Thibault J.F, Faulds C.B., Williamson G. (1994). Structure identification of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp by NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **263**:243-256.
- 48 Cooney C.L. (1981). Growth of microorganism. In *Biotechnology*, vol 1. Ed. H. J. Rehm and G. Reed. Verlag Chemie Weinheim. pp: 73-112.
- 49 Considine P.J., Hackett T.J., Coughlan M.P. (1987). Solid-state cultivation of *Penicillium capsilatum* on beet pulp. *Biotechnol. Lettrs.* **9**:131-134.
- 50 Coral G., Arikan B., Unaldi M.N. Guvenmez H. (2002). Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Z10 wild-type strain. *Turk. J. Biol.* **26**:209-213.
- 51 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. *J. Appl. Microbiol.* **90**:873-881.
- 52 Crepin V.F., Faulds C.B., Connerton I.F. (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**:647-652.
- 53 Criquet S. (2002). Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter. *J. Microbiol. Methods.* **50**:165-173.
-

- 
- 54 Desgranges C., Durand A. (1990). Effect of pCO<sub>2</sub> on growth, conidation and enzyme production in solid-state cultura on *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride*. *Enzyme Microbiol. Technol.* **12**:546-551.
- 55 Deschamps F., Giuliano C., Asther M., Huet M.C., Roussos S. (1985). Cellulase production by *Trichoderma harzianum* in static and mixed solid-state fermentation reactors under nonaseptic conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:1385-1388.
- 56 Durand A., Chereau D. (1988). A new pilot reactor for solid-state fermentation: application to the protein enrichment of sugar beet pulp. *Biotechnol. Bioeng.* **31**:476-786.
- 57 Durand A., de la Broise D., Blachere H. (1988). Laboratory scale bioreactor for solid state process. *J. Biotechnol.* **8**:59-66.
- 58 Durand A., Renaud R., Maratray J., Almanza S., Dies M. (1996). INRA-Dijon reactor for solid state fermentation: designs and applications. *J. Sci. Ind. Res.* **55**:317-332.
- 59 Faulds C.B., Williamson G. (1991). The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:2339-2345.
- 60 Faulds C.B., Bartolomé B., Williamson G. (1997). Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases. *Ind. Crop. Prod.* **6**:367-374.
- 61 Faulds C., Molina R., González R., Husband F., Juge N., Sanz-Aparicio J., Hermoso J. (2005). Probing the determinants of substrate speccificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from *Aspergillus niger*. *FEBS J.* **272**:4362-4371.
- 62 Faulds C.B. (2010). What can feruloyl esterases do for us?. *Phytochem. Rev.* **9**:121-132.
- 63 Fazary A.E., Ju Y.H. (2007). Feroloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochim. et Biophys. Sinica.* **39**:811-828.
- 64 Ferreira P., Diez N., Gutiérrez C., Soliveri J., Copa-Patiño J.L. (1999). *Streptomyces Avemitilis* CECT 3339 produces a ferulic acid esterase able to release ferulic acid from sugar beet pulp soluble feruloylated oligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* **79**:440-442.
- 65 Figueroa-Montero A.A. Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un Biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido (2011a). Tesis para obtener el grado de doctor. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México D.F.
- 66 Figueroa-Montero A., Esparza-Isunza T., Saucedo-Castañeda G., Huerta-Ochoa S., Gutierréz-Rojas M., Favela-Torres E. (2011b). Improvemnet of heat removal in solid-state fermentation tray bioreactors by forced air convection. *J. Chem. Techonol. Biotechnol.* **86**: 1321-1331.
- 67 FNP 52 Add 8 Food and Nutrition Paper (2000). Cellulose from *Penicullium funiculosum*.
-

- 
- 68 Friedman M., Jürgens H.S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **48**:2101-2110.
- 69 Frost J.W., Draths M., Ward T.L. (1998). Synthesis of quinic acid from glucose. U.S. Patent Documents, Patent Number 5789236. U.S. Cl. 435/136.
- 70 Galiotou-Panayotou M.P.R., Kapantai M. (1993). Enhanced polygalacturonase production by *Aspergillus niger* NRRL-364 grown on supplemented citrus pectin. *Lett. Appl. Microbiol.* **17**:145-148.
- 71 Gea T., Barrena R., Artola A., Sánchez A. (2004). Monitoring the biological activity of the composting process: oxygen uptake rate (OUR), respirometric index (RI) and respiratory quotient (RQ). *Biotechnol. Bioeng.* **88**:520-527.
- 72 Geankoplis C.J. (1998). Secado de materiales de proceso. En *Procesos de transporte y operaciones unitarias*. CECSA, México.
- 73 Gelmi C., Pérez-Correa R., González M., Agosin E. (2000). Solid substrate cultivation of *Gibberella fujikuroi* on an inert support. *Process Biochem.* **35**:1227-1233.
- 74 Gotteland M., de Pablo V S. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista Chilena de nutrición.* **34**:2-23.
- 75 Grajek W., Gervais P. (1987). Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* **9**:658-662.
- 76 Grant G.A., Han Y.W., Andersen A. W. (1978). Pilot-scale semisolid fermentation of straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:549-553.
- 77 Griffin D.M. (1981) Water and microbial stress. *Adv. Microbial. Ecology.* **5**:91-136.
- 78 Guevara, M.A. González-Jaen, M.T., Estévez, P. (1997). Multiple forms of pectin lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum f. sp. radialis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid. *C. J. Microbiol.* **43**:245-253.
- 79 Han Y. W. (1987). Oxygen requirement for growth of *Candida utilis* on semisolid straw substrate. *Biotechnol. Bioeng.* **30**:672-674.
- 80 Hegde S., Cavita S., Varadaraj M.C., Muralikrishna. (2006). Degradation of cereal bran polysaccharides acid by *Aspergillus niger* CFR 1105. *Food Chem.* **96**:14-19.
- 81 Henriksson G., Akin D.E., Slomczynski D., Eriksson L. (1999). Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. *J. Biotechnol.* **68**:115-123.
- 82 Hernández C.E., Chen H.H., Chang C.I., Huang T.C. (2009). Direct lipase-catalyzed lipophilization of chlorogenic acid from coffee pulp in supercritical carbon dioxide. *Industrial Crops and Products.* **30**:359-365.
-

- 
- 83 Herrera G.O. (2003). Obtención y selección de cepas de *Aspergillus niger* sobreproductoras de fitasa. Tesis para obtener del grado de maestro en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. México D.F.
- 84 Hoogschagen M., Zhu Y., As H., Tramper J., Rinzema A. (2001). Influence of wheat type and pretreatment on fungal growth in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lettrs.* **23**:1183-1187.
- 85 Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P. (1993). Microbial transformation of ferulic acid by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2244-2250.
- 86 Ieri F., Innocenti M., Andrenelli L., Vecchio V., Mulinacci N. (2011). *Food Chem.* **125**:750-759.
- 87 Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI), México. 2009. [www.inegi.org.mx](http://www.inegi.org.mx)
- 88 Kashyap D.R., Vohra P.K., Chopra S., Tewari R. (2001). Applications of pectinases in the comercial sector. *Bioresource Technol.* **77**:215-227.
- 89 Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., Taniguchi H. (2002) Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric. Food Chem.* **50**:2161-2168.
- 90 Kim J.H., Hosobuchi M., Kishimoto M., Seki T., Yoshida T., Taguchi H., Ryu D.D.Y. (1985). Cellulase production by a solid state culture system. *Biotechnol. Bioeng.* **27**:1445-1450.
- 91 Kim K.H., Tsao R., Yang R., Cui S.W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chem.* **95**:466-473.
- 92 Kishimoto N., Kakino Y., Iwai K., Fujita T. (2005). Chlorogenate hydrolase-catalyzed synthesis of hydroxycinnamic acid ester derivates by transesterification, substitution of bromine, and condensation reactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**:198-202.
- 93 Kroon P.A., Williamson G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food; current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* **79**:355-361.
- 94 Kulcu R., Yaldiz O. (2004). Determination of aereation rate and kinetics of composting some agricultural wastes. *Bioresource Technol.* **93**:49-57.
- 95 Kulcu R., Yaldiz O. (2008). Effect of air flow directions on composting process temperature profile. *Waste Management.* **28**:1766-1772.
- 96 Kweon M.H., Hwang H.J., Sung H.C. (2001). Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). *J. Agric. Food Chem.* **49**:4646-4655.

- 
- 97 Labat M., Augur C., Rio B., Perraud-Gaime I., Sayadi S. (2000). Biotechnological potentialities of coffee and similar with olive, two models of agroindustrial products rich in polyphenolic compounds. *Coffee Biotechnol. Qual.* pp 517-531.
- 98 Lakhtar H. (2009). Culture du *Lentinula edodes* plegier sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide: Transformation des polyphénols des margines. Thèse por obtenir le grade de docteur. Marsella, Francia.
- 99 Laukevics J.J., Apsite A.F., Viesturs U.E., Tengerdy R.P. (1984). Solid substrate fermentation of wheat atraw to fungal protein. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:1465-1474.
- 100 Leighton F., Urquiaga I., Soledad D.M. (1997). Propiedades antioxidantes del vino y sus componentes. Presentación de la 77<sup>a</sup> Asamblea General de la OIV y al XXII Congreso Mundial de la Vid y del Vino, Buenos Aires.
- 101 Levasseur A., Gouret P., Lesage-Meessen L., Asther M., Asther M., Record E., Pontarotti P. (2006). Tracking the connection between evolutionary and functional shifts using the fungal lipase/feruloyl esterase A family. *BMC Evolutionary Biol.* **6**:92-103.
- 102 Lindenfelser L.A., Ciegler, A. (1975). Solid-substrate fermented for ochratoxin a production. *Appl. Microbiol.* **29**:323-327.
- 103 Lonsane B.K., Guildyal N.P., Budiartman S., Ramakrishna S.V. (1985). Engineering aspects of solid state fermentation. *Enzyme Microbiol. Technol.* **7**:258-265.
- 104 Maciel G.M., Porto de Souza V.L., Isidoro H.C.W., Cancio F.R., Della B.B.E., Quintella da Silva B.T., Pandey A., Soccol C.R. (2008). Xylanase production by *Aspergillus niger* LBP 326 in solid-state fermentation using statistical experimental designs. *Food Technol. Biotechnol.* **46**(2):183-189.
- 105 Malvessi E., Moura da Silva M. (2004). Influence of médium composition and pH on the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **47**:693-702.
- 106 Manach C., Sacalbert A., Morand C., Remesey C., Jiménez L. (2004). Plyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**:727-747.
- 107 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: Sera T., C. Soccol A. Pandey, S. Roussos. Coffee biotechnology and quality.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Neterhlands. Capitulo 45. pp: 471-488.
- 108 Mateos D.J.C., Rodríguez J.A., Roussos S., Córdova J., Abousalham A., Carreire F., Baratti J. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable

- when produced using solid state fermentation than liquid fermentation procedures. *Enzyme Microbial. Technol.* **39**: 1042-1050.
- 109 Martín A. (1980). Descomposición de la lignin. En: Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Calypso. México D.F. pp:190-195.
- 110 McAuley K.E., Svendsen A. Patkar S.A., Wilson S. (2004). Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*. *Acta Cryst. Section D.* **60**:878-887.
- 111 McCabe W.L., Smith J.C., Harriot P. (2000). Drying of Solids. In: *Unit operations of chemical engineering*, 6<sup>th</sup> Ed. McGraw Hill, USA. pp: 773-811.
- 112 McCrae S.L., Leith K.M., Gordon A.H., Wood T.M. (1994). Xylan-degrading system produced by fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterization of a feruloyl esterase and a *p*-cumaroyl esterase. *Enzyme Microbial. Technol.* **16**:826-834.
- 113 Mikulič P.M., Usenik V., Štampar F. (2003). The role of chlorogenic acid en the resistance of apples to apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wind. Aderh.) *Zb. Biotech. Fak. Univ. Ljublj. Kmet.* **81**(2):233-242.
- 114 Minjares Carranco A.; Trejo Aguilar B.A.; Aguilar G., Viniegra-González G. (1997). Physiochemical comparison between pectinase producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme Microbial. Technol.* **21**:25-31.
- 115 Mitchell D.A., Doelle H.W., Greenfield P.F. (1988). Improvement of growth of *Rhizopus oligosporus* on a model solid substrate. *Biotechnol. Lett.* **10**:497-502.
- 116 Molina M., Lechuga O.R., Bressani R. (1990). Valor nutritivo de la pulpa de café sometida a fermentación sólida usando *Aspergillus niger* en pollos y cerdos. *Agron. Mesoa.* **1**:79-82.
- 117 Montgomery D.C. (2006). Diseños factoriales fraccionados de dos niveles. *Diseño y análisis de experimentos*. 2<sup>a</sup> Ed. Limusa Wiley, México. pp 337-346.
- 118 Moo-Young M., Moreira A.R., Tengerdy R.P. (1983). Principles of solid-substrate fermentation. In: *The Filamentous Fungi*, Vol. 4. Ed. Smith J.E.; Berry D.R. and Kriistiansen B. Edward Arnold. London. pp: 117-144.
- 119 Morton A.G., MacMillan A. (1954). The assimilation of nitrogen from ammonium salts and nitrate by fungi. *J. Exptl. Botany.* **5**:232-252.
- 120 Mudgett R.E. (1986). Solid-state fermentations. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed. A.L. Demain and H.A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp: 66-83.
- 121 Mugnier J., Jung G. (1985). Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. *Appl. and Environ. Microbiol.* 108-114.

- 
- 122 Murthy P.S., Manonmani H.K. (2008). Bioconversion of coffee industry wastes with rot fungus *Pleurotus florida*. *Res. J. Environ. Sci.* **2**:145-150.
- 123 Naczek M., Shahidi F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *J. Chrom. A* **1054**:95-111.
- 124 Narahara H., Koyama Y., Yoshida T., Pichangkura S., Ueda R., Taguchi H. (1982). Growth and enzyme production in a solid-state culture of *Aspergillus oryzae*. *J. Ferment. Technol.* **60**:311-319.
- 125 Narasimha G., Sridevi A., Buddolla V., Subhosh C.M., Rajasekhar R.B. (2006). Nutrient effect on production of cellulolytic enzyme by *Aspergillus niger*. **5**:472-476.
- 126 Nishio N., Tai K., Nagai S. (1979). Hydrolase production by *Aspergillus niger* in solid state cultivation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **8**:263-270.
- 127 Nunes F.M., Coimbra M.A. (2010). Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. *Phytochem. Rev.* **9**:171-185.
- 128 Oriol E., Contreras R., Raimbault M. (1987). Use of microcalorimetry for monitoring the solid state culture of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Tech.* **1**:79-84.
- 129 Palacios P.S., Wilson E.G., Debenedetti S.L. (1999). Análisis por HPLC de ácidos cafeilquínicos presentes en tres especies de *Baccharis Dominguezis*. **15**:39-46.
- 130 Palumbo J.D., Keefe T.L., Mahoney N.E. (2007). Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia*. **164**:241-248.
- 131 Pan G.X., Bolton J.L., Leary G.J. (1998). Determination of ferúlico and *p*-coumaric acids in wheat straw and the amount released by mild acid and alkaline peroxide treatment. *J. Agric. Food Chem.* **46**:5283-5288.
- 132 Pandey A., Selvakumar P., Soccol C., Nigam P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.* **77**:149-162.
- 133 Pandey A., Soccol C.R., Nigam P., Brad D., Mohan R., Roussos S. (2000). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochem. Eng.* **6**:153-162.
- 134 Pandey A., Soccol C.R., Rodríguez-León J., Nigam P. (2001). Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. *Asiatech Publishers INC.* pp:32-51.
- 135 Pandey A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **13**:81-84.
- 136 Patil S.R., Dayanand A. (2006). Production of pectinasa from deseeded sunflower head by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state conditions. *Biores. Technol.* **97**:2054-2058.

- 
- 137 Peñaloza W., Molina R.M., Gómez- Brenes R., Brezan R. (1985). Solid-State Fermentation and Alternative to Improve the Nutritive Value of Coffee Pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:388-393.
- 138 Perry R.H., Green D.W. (1999). Chemical engineers Handbook, 6<sup>th</sup> ed. McGraw Hill, New York.
- 139 Pliego-Sandoval J., Amaya-Delgado L., Mateos-Díaz J.C., Rodríguez J., Córdova J., Alba A., Jaubet S., Herrera-López E.J. (2012). Multiplex gas sampler for monitoring respirometry in column-type bioreactors used in solid –state fermentation. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 3031-3038.
- 140 Pothiraj C., Balaji P., Eyini M. (2006). Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. *African J. Biotechnol.* **5**:1882-1885.
- 141 Prior A.B., DuPreez J.C., Rein P.W. (1992) Environmental parameters. In: *Solid substrate cultivation*. Ed. Elsevier Applied Science.
- 142 Puyuelo B., Gea T., Sánchez A. (2010). A new control strategy for the composting process based on the oxygen uptake rate. *Chem. Eng. J.* **165**:161-169.
- 143 Raimbault M., Alazard D. (1980). Culture method to study fungal growth in solid fermentation. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **9**:199-209.
- 144 Ralet M.C., Faulds C.B., Williamson G., Thibault J.F. (1994). Degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar-beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydr. Res.* **263**:257-269.
- 145 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 esterase, tannases and chlorogenate esterases. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **151**:711-723.
- 146 Rawashdeh R., Saadoun I., Mahasneh A. (2005). Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *Afr. J. Biotechnol.* **4**: 251-255.
- 147 Record E., Asther M., Sigoillot C., Pages S., Punt P.J., Delattre M., Haon M., van den Holdel A.A. M.J.J., Sigoillot J.C., Lesage-Meessen (2005). Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **62**:349-355.
- 148 Reid I.D. (1989). Solid-state fermentations for biological delignification. *Enzyme Microb. Technol.* **11** 786-803.
-

- 
- 149 Renard C.M.G.C., Vorage A.G.J., Thiabault J.F., Pilnik W. (1991). Studies on Apple protopectin V: Structural studies on enzymatically extracted pectins. *Carbohydr. Polym.* **16**:137-154.
- 150 Reyes-Cruz R.Y. (2004). Seminario II. Alimentos funcionales en la nutrición humana: Estrés oxidativo y fisiología gastrointestinal. Universidad de Costa Rica UCR.
- 151 Rifaat H.M., Nagieb Z.A., Ahmed Y.M. (2005). Production of xylanases by *Streptomyces* species and their bleaching effect on rice straw pulp. *Appl. Ecol. Environ. Res.* **4**:151-160.
- 152 Rodríguez Le6n J.A., Echevarria J., Sierra N., Daniel A., Martinez O. (1985). Solid-state fermentation of dried citrus peel. *Biotechnol. Lett.* **7**:577-580.
- 153 Roussos S., Olmos A., Raimbault M., Saucedo-Castañeda G., Lonsane B.K. (1991). Strategies for large scale inoculums development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol. Tech.* **5**:415-420.
- 154 Roussos S., Aquíhuatl M de A., Trejo-Hernández M. del R., Perraus G.I., Favela E., Ramakrishna M., Raimbault M., Viniegra G.G. (1995). Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**:746-762.
- 155 Ruiz Sánchez Patricia (2002). Producción de cafeoil, feruoiyl p-cumaroil esterases por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono. Tesis de maestría en Biotecnología, UAM-Iztapalapa. México DF.
- 156 Saucedo-Castañeda G., Lonsane B.K., Raimbault M. (1992). Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid-state fermentation system. *Process Biochem.* **27**:97-107.
- 157 Saucedo-Castañeda G., Trejo-Hernández M.R., Lonsane B.K., Navarro J.M., Roussos S., Dufour D., Raimbault M. (1994). On-line Automated Monitoring and Control Systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in Aerobic and Anaerobic Solid-State Fermentations. *Process Biochem.* **29**:13-24.
- 158 Schwab D., Herling A.W., Hemmerle H., Schubert G., Hagenbuch B., Burger H. J. (2001). Hepatic uptake of synthetic chlorogenic acid derivatives by the organic anion transport proteins. *J. Pharma. Exp. Therap.* **296**:91-95.
- 159 Seshime Y., Praveen R.J., Funii I., Kitamoto K., (2005). Genomic evidence for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **337**, 747-751.
- 160 Shöbel B., Polimann W. (1980). Futher characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Z. Naturforsch. C.* **35**:699-701.
-

- 
- 161 Silman R.W., Conway H.F., Anderson R.A., Bagley E.B. (1979). Production of aflatoxin in corn by a large-scale solid-substrate fermentation process. *Biotechnol. Bioeng.* **21**:1799-1808.
- 162 Silman R.W. (1980). Enzyme formation during solid-substrate fermentation in rotating vessels. *Biotechnol. Bioeng.* **22**:411-420.
- 163 Solís-Pereira S., Favela-Torres E., Viniegra-González G., Guitiérrez-Rojas M. (1993). Effects of different carbón sources on the synthesis of pectinase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**:36-41.
- 164 Smith J.E., Aidoo K.E. (1988). Growth of fungi on solid substrate. In *Physiology of Industrial Fungi*, ed. D.R. Berry. Blackwell Scientific Publ., Oxford. pp: 249-269.
- 165 Smits J.P., Rinzema A., Tramper J., Van Sonsbeek H.M., Knol W. (1996). Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance enzyme production, growth and kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**:489-496.
- 166 Smith M., Weaver V., Young D., Ornston N. (2003). Genes for chlorogenate and hydroxycinnamate catabolism (*hca*) are linked to functionally related genes in the *dca-pca-qui-pob-hca* chromosomal cluster of *Acinetobacter* sp. strain ADP1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:524-532.
- 167 Solis L. D., Herrera C. H. (2005). Desarrollo de un método de análisis para a cuantificación de ácidos clorogénicos en café. *Agro. Costarricense.* **29**:99-107.
- 168 Tanaka T., Kojima T., Kawamori T. (1993). Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferúlico acid. *Carcinogenesis.* **14**:1321-1325.
- 169 Taragano V., Sánchez V.E., Pilosof A.M.R. (1997). Combined effect of wáter activity depression and glucose addition on pectinase and protease production by *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* **3**:233-236.
- 170 Torres-Mancera Ma.T., Córdova-López J., Rodríguez-Serrano G., Roussos S., Ramírez-Coronel A., Favela-Torres E., Saucedo-Castañeda G (2011). Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technol. Biotechnol.* **49**:369-373.
- 171 Torres y Torres J.L., Rosazza J.P.N. (2001). Microbial transformations of *p*-coumaric acid by *Bacillus megaterium* and *Curvularia lunata*. *J. Natural Prod.* **64**:1408-1414.
- 172 Urbaneja G., Ferrer R.J., Páez G., Arenas de Moreno L., Colina G., Sandoval L. (1996). Hidrólisis ácida y caracterización de carbohidratos de la pulpa de café. *Rev. Fac. Agron.* **14**:265-275.
- 173 VanDemark P.J., Batzing B.L. (1987). The microbes. An introduction to their nature and importance. Benjamin/Cummings, Menlo Park. pp: 162-165.
-

- 
- 174 Van Lier J.J.C., Van Ginkel J.T., Straatsma G., Gerrits J.P.G., Van Griensven L.J.L.D. (1994). Composting of mushroom substrate in a fermentation tunnel: compost parameters and a mathematical model. *Neth. J. Agric. Sci.* **42**:271-292.
- 175 Viniegra González G., Favela Torres E., Aguilar C., Romero Gómez S., Díaz Godínez G., Augur C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* **13**:157-167.
- 176 Vries R. P., Visser J. (2001). *Aspergillus* Enzyme Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiol. Molec. Biol.* **65**:497-522.
- 177 Wang D.I.C., Cooney C.L., Demain A.L., Dunnill P., Humphrey A.E., Lilly M.D. (1979). Fermentation and enzyme technology. John Wiley and Song. New York.
- 178 Wang J., Lu D., Zhao H., Ling X., Jiang B., Ouyang P. (2009). Application of response surface methodology optimization for the production of caffeic acid from tobacco waste. *A. J. Biotechnol.* **8**:1416-1424.
- 179 Waterman P.G., Mole S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh.
- 180 Weber F.J., Oostra J., Tramper J., Rinzema A. (2001). Validation of a model for process development and scale-up of packed-bed solid-state bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **77**:381-393.
- 181 Williamson G., Faulds C.B., Kroon P.A. (1998). Specificity of ferulic acid (feruloyl esterase). *Biochem. Soc. Transact.* **26**:205-209.
- 182 Yuan B., Qiao M., Xu H., Wang L., Li F. (2006). Determination of chlorogenic acid in rat plasma by high performance chromatography after peritoneal administration of compound daqingye injection. *J. Pharm. Soc. Jpn.* **129**:811-814.
- 183 Zhao Y., Sinnot M. (2000). A New Affinity Ligand for the Isolation of a Single Feruloyl Esterase (FES-III) from *Aspergillus niger*. *Bioorg. Med. Chem.* **8**:917-924.

## 17 ANEXOS

### ANEXO 1. ANALISIS ESTADÍSTICO DEL MODELO LOGÍSTICO Y DEL MODELO DE GOMPERTZ

En la Tabla A-1 se presenta la suma del cuadrado del error (SC) y la  $R^2$  del ajuste del modelo Logístico y del modelo de Gompertz para los datos experimentales de la TPC para la fermentación en columnas

**Tabla A-1.** Análisis estadístico de los modelos Logístico y de Gompertz para la fermentación en columnas

Ensayo	Modelo Logístico		Modelo Gompertz	
	SC	$R^2$	SC	$R^2$
<i>R. pusillus</i>	53.46	0.901	11.39	0.962
<i>Trametes</i> sp.	23.67	0.956	7.68	0.974
<i>A. tamaritii</i>	79.56	0.976	37.91	0.981
<i>A. niger</i> (CH4)	67.34	0.894	27.40	0.904

El modelo de Gompertz ajustado a los datos experimentales de la TPC presentó la menor suma del cuadrado del error y la mayor  $R^2$  para todos los ensayos realizados.

En la Tabla A-2 se presenta la suma del cuadrado del error (SC) y la  $R^2$  del ajuste del modelo Logístico y del modelo de Gompertz para los datos experimentales de la TPC del diseño experimental tipo Plackett-Burman.

**Tabla A-2.** Análisis estadístico de los modelos Logístico y de Gompertz para el diseño experimental tipo Plackett-Burman

Ensayo	Modelo Logístico		Modelo Gompertz	
	SC	$R^2$	SC	$R^2$
M1	15.43	0.835	2.74	0.978
M2	5.56	0.852	0.55	0.989
M3	3.23	0.882	0.24	0.994
M4	14.53	0.812	1.83	0.971
M5	5.64	0.846	0.65	0.985
M6	14.89	0.835	2.19	0.979
M7	13.23	0.878	1.00	0.992
M8	15.16	0.837	2.48	0.980

El modelo de Gompertz ajustado a los datos experimentales de la TPC presentó la menor suma del cuadrado del error y la mayor  $R^2$  para todos los ensayos realizados en el diseño experimental tipo Plackett-Burman en comparación con el ajuste del modelo Logístico.

En las Tablas A-3 y A-4 se presenta el cuadrado del error ( $s$ ) y la  $R^2$  del ajuste del modelo Logístico y del modelo de Gompertz para los datos experimentales de la TPC y la TPO del diseño central compuesto.

**Tabla A-3.** Análisis estadístico de la TPC de los modelos Logístico y de Gompertz para el diseño factorial central compuesto

Ensayo	Modelo Logístico		Modelo Gompertz	
	SC	$R^2$	SC	$R^2$
M1	86.62	0.914	39.18	0.983
M2	64.84	0.905	24.74	0.995
M3	203.84	0.827	46.21	0.980
M4	92.49	0.902	30.19	0.989
M5	55.17	0.936	34.18	0.983
M6	124.24	0.880	42.97	0.979
M7	96.06	0.903	21.13	0.994
M8	103.23	0.921	23.85	0.990
M9	88.76	0.923	32.94	0.987
M10	111.52	0.905	36.94	0.987
M11	148.52	0.865	48.42	0.976
M12	75.41	0.900	20.82	0.986
M13	116.18	0.938	31.49	0.986
M14	251.11	0.904	86.74	0.967
M15	227.18	0.816	72.00	0.975
M16	207.54	0.823	73.11	0.974

**Tabla A-4.** Análisis estadístico de la TCO de los modelos Logístico y de Gompertz para el diseño factorial central compuesto

Ensayo	Modelo Logístico		Modelo Gompertz	
	SC	R <sup>2</sup>	SC	R <sup>2</sup>
M1	83.81	0.920	22.47	0.979
M2	87.53	0.921	13.63	0.986
M3	93.04	0.913	24.61	0.976
M4	96.32	0.921	18.75	0.984
M5	57.02	0.919	20.13	0.979
M6	102.24	0.915	24.49	0.976
M7	23.04	0.919	14.73	0.989
M8	40.86	0.891	19.31	0.984
M9	48.12	0.936	20.90	0.984
M10	45.93	0.879	26.11	0.972
M11	94.25	0.903	31.60	0.971
M12	32.84	0.881	17.83	0.973
M13	46.60	0.932	30.28	0.987
M14	93.14	0.910	51.39	0.968
M15	102.58	0.927	45.01	0.982
M16	100.76	0.925	43.89	0.984

El modelo de Gompertz ajustado a los datos experimentales de la TPC y TPO presentó la menor suma de cuadrado del error y la mayor R<sup>2</sup> en comparación con el ajuste del modelo Logístico para todos los ensayos realizados en el diseño central compuesto.

## ANEXO 2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO DE MEZCLAS

En la Tabla A-5 se presenta el análisis estadístico de los diferentes modelos probados para la variable respuesta concentración de ACl extraído por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados.

**Tabla A-5.** Análisis estadístico de los modelos probados para la concentración de ACl usada como variable respuesta

<b>Modelo</b>	<b>F</b>	<b>Nivel de significancia</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Linear	21.2	<0.001	0.872
Cuadrático	29.8	<0.001	0.912
Especial Cúbico	11.6	0.002	0.582
Cúbico	10.1	0.001	0.611

El modelo que mejor se ajustó a la concentración de ACl liberado por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados fue el modelo cuadrático. En la Tabla A-6 se muestra el análisis estadístico que se realizó a los coeficientes de determinación que conforman el modelo cuadrático, para el ACl extraído.

**Tabla A-6.** Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo cuadrático para el ACl extraído

<b>Factor</b>	<b>Coficiente</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<i>A</i>	1038.1	17.5	<0.001
<i>B</i>	1089.5	18.4	<0.001
<i>C</i>	284.9	4.8	<0.001
<i>AB</i>	1735.8	6.4	<0.001
<i>AC</i>	1496.9	5.5	<0.001
<i>BC</i>	1225.3	4.5	<0.001

Todos los coeficientes de determinación  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_{1,2}$ ,  $\beta_{1,3}$ ,  $\beta_{2,3}$  del modelo cuadrático con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  fueron diferentes de cero

En la Tabla A-7 se presenta el análisis estadístico de los diferentes modelos probados para la concentración de AC extraído como variable respuesta por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados.

**Tabla A-7.** Análisis estadístico de los modelos probados para la concentración de AC como variable respuesta

<b>Modelo</b>	<b>F</b>	<b>Nivel de significancia</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Linear	6.0	0.006	0.308
Cuadrático	7.4	0.001	0.642
Especial Cúbico	178.8	<0.001	0.959
Cúbico	116.4	<0.001	0.997

El modelo que mejor se ajustó a la concentración de AC liberado por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados fue el modelo cúbico. En la Tabla A-8 se muestra el análisis estadístico que se realizó a los coeficientes de determinación que conforman el modelo cúbico, para la extracción de AC

**Tabla A-8.** Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo cúbico para la extracción del AC

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<i>A</i>	319.40	55.85	<0.001
<i>B</i>	246.53	43.11	<0.001
<i>C</i>	595.83	104.19	<0.001
<i>AB</i>	-811.37	-28.94	<0.001
<i>AC</i>	-955.63	-34.08	<0.001
<i>BC</i>	-1523.81	-54.35	<0.001
<i>ABC</i>	8169.02	44.42	<0.001
<i>AB(A-B)</i>	-1141.49	-12.26	<0.001
<i>AC(A-C)</i>	1303.67	14.00	<0.001

Todos los coeficientes de determinación del modelo cúbico con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  fueron diferentes de cero.

En la Tabla A-9 se presenta el análisis estadístico de los diferentes modelos probados para la concentración de AF extraído como variable respuesta por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados.

**Tabla A-9.** Análisis estadístico de los modelos probados para la concentración de AF como variable respuesta

<b>Modelo</b>	<b>F</b>	<b>Nivel de significancia</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Linear	2.63	0.089	0.163
Cuadrático	9.86	<0.001	0.625
Especial Cúbico	1.56	0.223	0.649
Cúbico	85.53	<0.001	0.962

El modelo que mejor se ajustó a la concentración de AF liberado por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados fue el modelo cúbico. En la Tabla A-10 se muestra el análisis estadístico que se realizó a los coeficientes de determinación que conforman el modelo cúbico.

**Tabla A-10.** Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo cúbico para el AF extraído

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<i>A</i>	27.28	34.14	<0.001
<i>B</i>	24.09	30.15	<0.001
<i>C</i>	24.36	30.48	<0.001
<i>AB</i>	-43.43	-11.08	<0.001
<i>AC</i>	-11.83	-3.02	0.006
<i>BC</i>	-3.60	-0.92	0.369
<i>ABC</i>	-92.90	-3.61	0.002
<i>AB(A-B)</i>	79.58	6.11	<0.001
<i>AC(A-C)</i>	-170.13	-13.07	<0.001

El coeficiente de determinación del término *BC* no fue diferente de cero.

En la Tabla A-11 se presenta el análisis estadístico de los diferentes modelos probados para la variable respuesta concentración de ApC extraído por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados.

**Tabla A-11.** Análisis estadístico de los modelos probados para la concentración de ApC como variable respuesta

<b>Modelo</b>	<b>F</b>	<b>Nivel de significancia</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Linear	5.2	0.012	0.279
Cuadrático	0.9	0.432	0.356
Especial Cúbico	11.1	0.002	0.565
Cúbico	45.2	<0.001	0.918

El modelo que mejor se ajustó a la concentración de ApC liberado por cada uno de los extractos enzimáticos ensayados fue el modelo cúbico. En la Tabla A-12 se muestra el análisis estadístico que se realizó a los coeficientes de determinación que conforman el modelo cúbico.

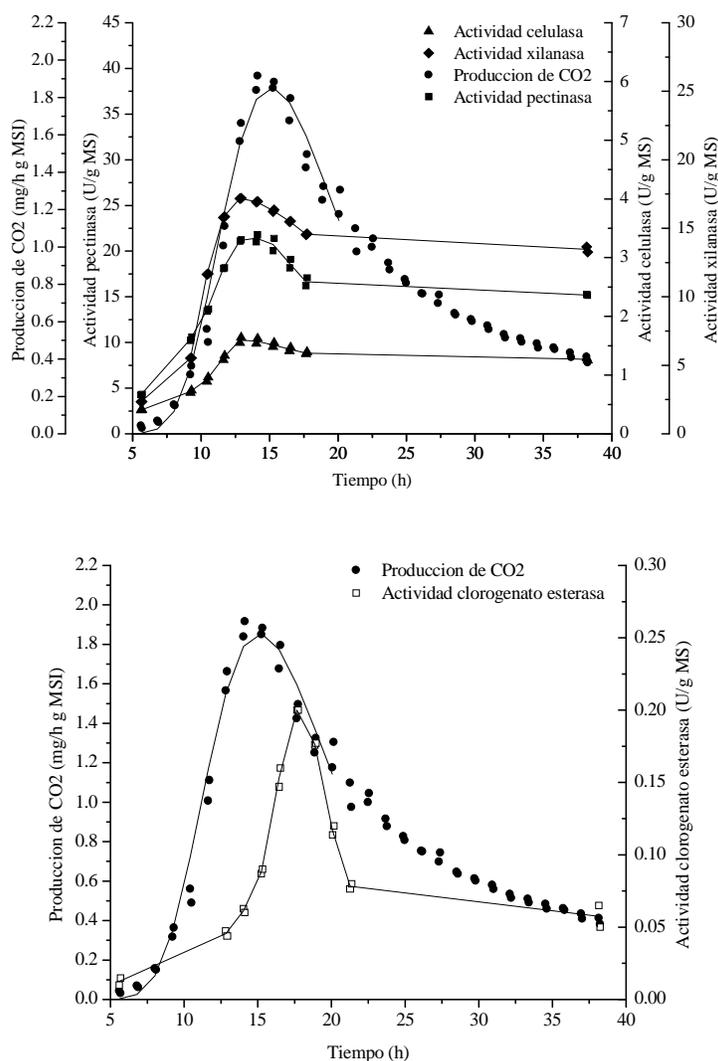
**Tabla A-12.** Análisis estadístico de los coeficientes de determinación del modelo cúbico para el ApC extraído

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<i>A</i>	0.9	14.5	<0.001
<i>B</i>	0.7	10.2	<0.001
<i>C</i>	0.9	14.7	<0.001
<i>AB</i>	-1.5	4.5	<0.001
<i>AC</i>	-0.9	2.8	0.011
<i>BC</i>	-1.9	5.9	<0.001
<i>ABC</i>	15.6	7.3	<0.001
<i>AB(A-B)</i>	3.7	3.4	0.002
<i>AC(A-C)</i>	6.5	5.9	<0.001

Todos los coeficientes de determinación del modelo cúbico con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  fueron diferentes de cero.

### ANEXO 3. PERFILES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA PARA LOS ENSAYOS DEL DISEÑO EXPERIMENTAL TIPO PLACKETT-BURMAN

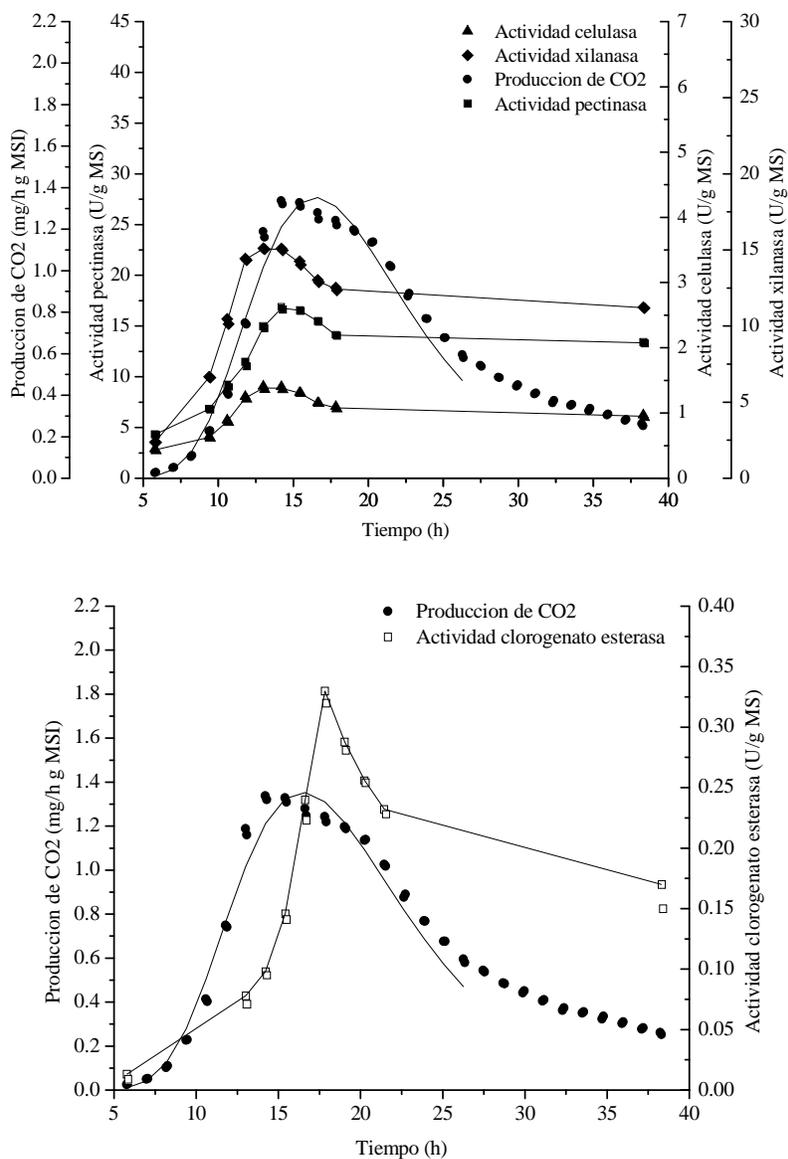
En la Figura A-1 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M1.



**Figura A-1.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub> para el ensayo M1

La máxima producción de CO<sub>2</sub> se alcanzó a las 15 h de cultivo. La mayor APec, AXil y ACel, se presentó una hora antes que la máxima TPC. La CIE se presentó 2 h después de tener la máxima TPC. Cuando se tuvo la máxima APec la actividad CIE fue  $0.04 \pm 0.02$  U/g MS.

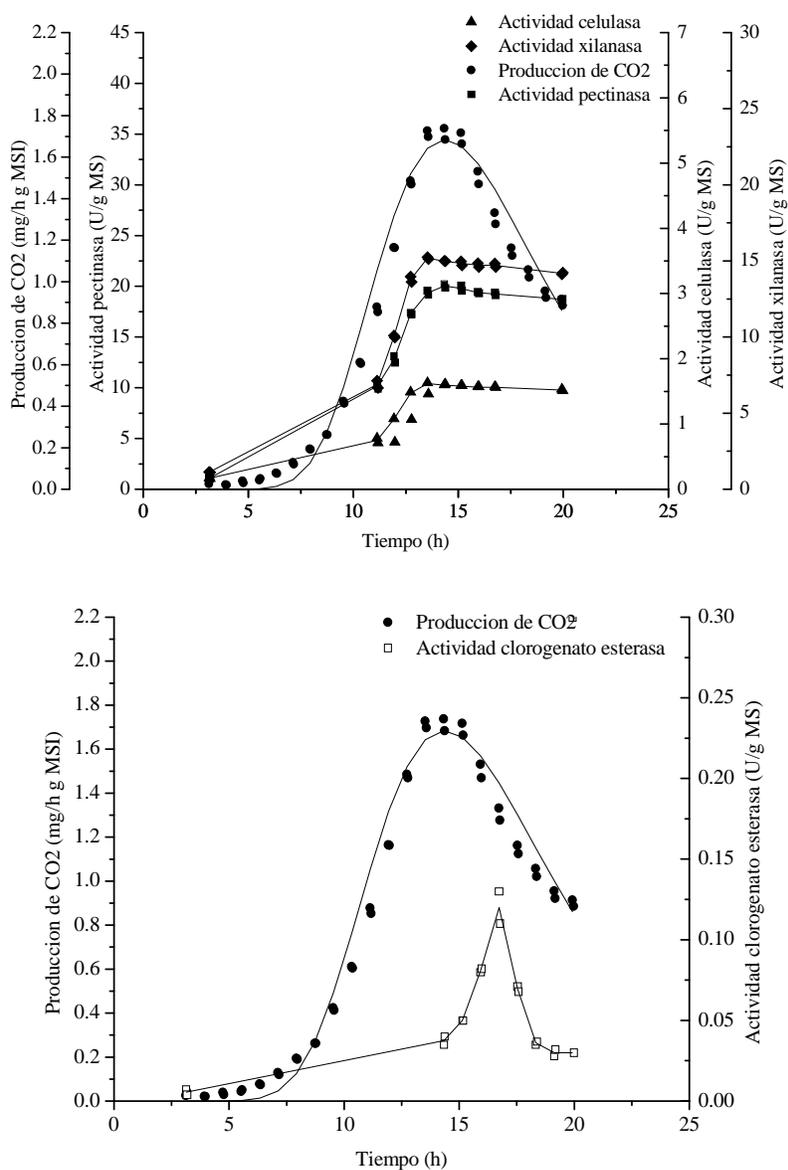
En la Figura A-2 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M2.



**Figura A-2.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub> para el ensayo M2

La máxima producción de CO<sub>2</sub> se alcanzó a las 17 h de cultivo. La mayor actividad APec, AXil y ACel, se presentó aproximadamente 3 y 2 h antes que la máxima producción de CO<sub>2</sub> y la CIE se presentó una hora después de tener la máxima TPC. Cuando se tiene la máxima APec se tiene poca actividad CIE,  $0.1 \pm 0.01$  U/g MS.

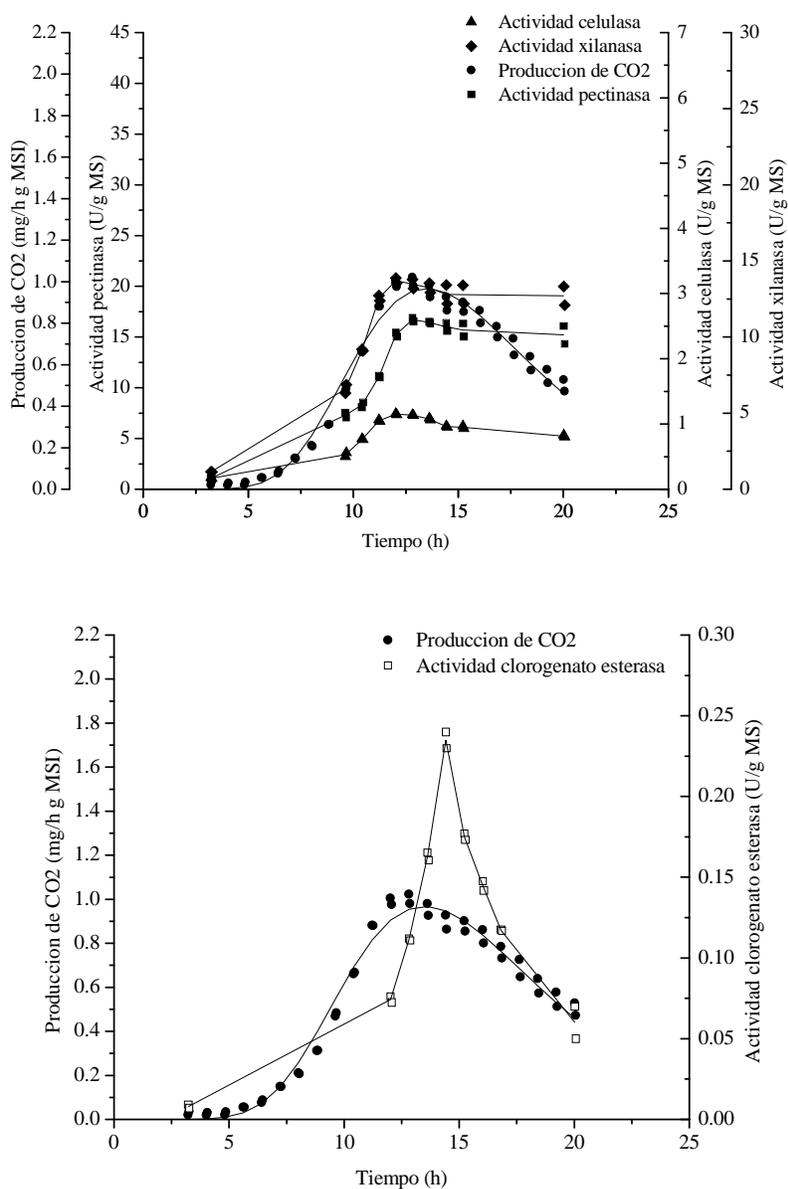
En la Figura A-3 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M4.



**Figura A-3.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub> para el ensayo M4

La máxima producción de CO<sub>2</sub> se alcanzó a las 15 h de cultivo. La mayor actividad APec, AXil y ACel, se presentó aproximadamente una hora antes que la máxima producción de CO<sub>2</sub> y la CIE se presentó 3 h después de tener la máxima TPC. Cuando se tiene la máxima APec se tiene poca actividad CIE,  $0.04 \pm 0.02$  U/g MS.

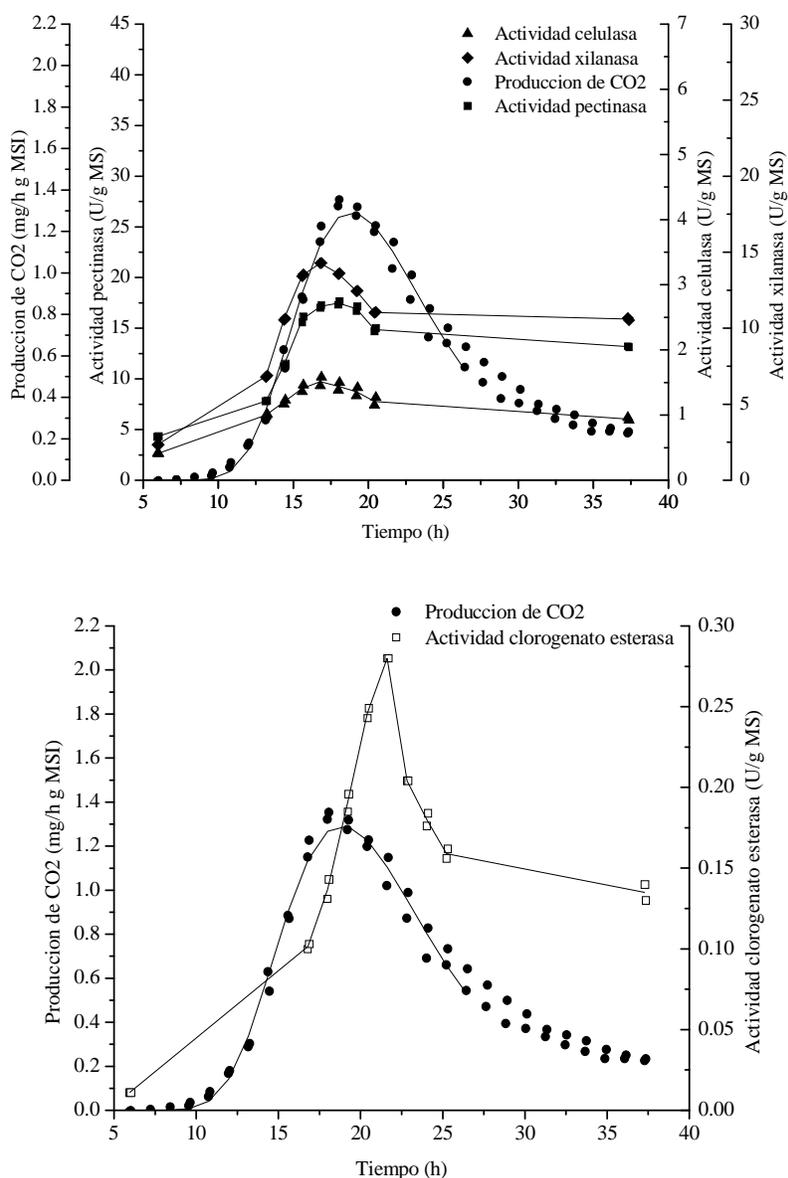
En la Figura A-4 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M5.



**Figura A-4.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub> para el ensayo M5

La máxima producción de CO<sub>2</sub> se alcanzó a las 12 h de cultivo. La mayor actividad APec, AXil y ACel, se presentó aproximadamente una hora después que la máxima producción de CO<sub>2</sub> y la CIE se presentó 3 h después de tener la máxima TPC. Cuando se tiene la máxima APec se tiene poca actividad CIE,  $0.11 \pm 0.02$  U/g MS.

En la Figura A-5 se presentan los perfiles de actividad enzimática para el ensayo M7.



**Figura A-5.** Perfil de actividades enzimáticas y producción de CO<sub>2</sub> para el ensayo M7

La máxima producción de CO<sub>2</sub> se alcanzó a las 17 h de cultivo. La mayor actividad APec, AXil y ACel, se presentó aproximadamente 2 h antes que la máxima producción de CO<sub>2</sub> y la CIE se presentó 3 h después de tener la máxima TPC. Cuando se tiene la máxima APec se tiene poca actividad CIE,  $0.14 \pm 0.03$  U/g MS.

#### ANEXO 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL TIPO PLACKETT-BURMAN

En la Tabla A-13 se presenta el análisis estadístico de los efectos normalizados de los factores del diseño experimental tipo Plackett-Burman sobre la APec, AXil y ACel.

**Tabla A-13.** Análisis estadístico de los efectos normalizados de los factores sobre la APec, AXil y ACel

<b>Factor</b>	<b>Efecto</b>	<b>Error estándar</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Sacarosa	0.51	0.004	47.20	< 0.001
Maltosa	0.07	0.004	1.46	0.201
Soln Oligo	0.16	0.004	34.12	< 0.001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.47	0.004	45.74	< 0.001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.36	0.004	20.46	< 0.001
Temperatura	0.47	0.004	44.64	< 0.001
Tamaño de partícula	-0.07	0.004	10.08	< 0.001

Se observa que la concentración de maltosa no tuvo un efecto significativo sobre la APec, AXil y ACel.

En la Tabla A-14 se presenta el análisis estadístico de los efectos normalizados de los factores del diseño experimental tipo Plackett-Burman sobre la ACIE.

**Tabla A-14.** Análisis estadístico de los efectos normalizados de los factores sobre la ACIE

<b>Factor</b>	<b>Efecto</b>	<b>Error estándar</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
Sacarosa	-0.43	0.004	15.38	< 0.001
Maltosa	0.54	0.004	19.00	< 0.001
Soln Oligo	-0.20	0.004	6.93	< 0.035
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-0.40	0.004	14.17	< 0.001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-0.35	0.004	12.36	< 0.001
Temperatura	0.45	0.004	15.98	< 0.001
Tamaño de partícula	0.01	0.004	0.03	0.771

Se observa que el tamaño de partícula no tuvo un efecto significativo sobre la ACIE.

## ANEXO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL DISEÑO CENTRAL COMPUESTO

En la Tabla A-15 se presenta el análisis estadístico del modelo que ajustó la variable respuesta APec con un nivel de significancia  $\alpha < 0.04$  y una  $R^2$  de 0.8890.

**Tabla A-15.** Análisis estadístico del modelo que se ajustó a la APec usada como la variable respuesta

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<i>Ordenada</i>	-113.27	4.34	< 0.001
$X_1$	38.21	5.68	< 0.001
$X_1^2$	-3.65	6.05	< 0.001
$X_2$	17.19	4.01	0.001
$X_2^2$	-2.95	2.17	0.040
$X_3$	39.31	4.59	< 0.001
$X_3^2$	-5.55	4.09	< 0.001
$X_1X_2$	1.18	2.44	0.002
$X_1X_3$	-0.63	2.77	0.002
$X_2X_3$	2.70	2.20	0.038

$X_1$ : Sacarosa;  $X_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $X_3$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Todos los coeficientes de determinación del modelo de segundo orden para el diseño central compuesto con 3 factores fueron diferentes de cero.

En la Tabla A-16 se presenta el análisis estadístico del modelo que ajustó la variable respuesta AXil con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  y una  $R^2$  de 0.8639.

Todos los coeficientes de determinación del modelo de segundo orden para el diseño central compuesto con 3 factores teniendo como variable respuesta la AXil fueron diferentes de cero.

**Tabla A-16.** Análisis estadístico del modelo que se ajustó a la AXil variable respuesta usada como variable respuesta

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<i>Ordenada</i>	-36.06	3.17	0.004
$X_1$	16.40	5.61	<0.001
$X_1^2$	-1.61	6.14	<0.001
$X_2$	5.73	3.54	0.004
$X_2^2$	-1.19	4.02	0.004
$X_3$	14.55	3.91	<0.001
$X_3^2$	-2.37	4.01	<0.001
$X_1X_2$	0.46	3.30	0.005
$X_1X_3$	-0.09	3.24	0.005
$X_2X_3$	-0.74	3.37	0.003

$X_1$ : Sacarosa;  $X_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $X_3$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

En la Tabla A-17 se presenta el análisis estadístico del modelo que ajustó a la CIE usada como variable respuesta con un nivel de significancia  $\alpha < 0.001$  y una  $R^2$  de 0.9358.

**Tabla A-17.** Análisis estadístico del modelo que se ajustó a la ACIE variable respuesta usada como variable respuesta

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>t</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<i>Ordenada</i>	0.686	11.30	<0.001
$X_1$	-0.108	6.95	<0.001
$X_1^2$	0.005	3.37	0.003
$X_2$	-0.070	3.53	0.002
$X_2^2$	0.005	1.55	0.135
$X_3$	-0.071	3.58	0.002
$X_3^2$	0.004	1.11	0.279
$X_1X_2$	0.006	3.31	0.003
$X_1X_3$	0.009	4.57	<0.001
$X_2X_3$	0.001	0.24	0.812

$X_1$ : Sacarosa;  $X_2$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ;  $X_3$ :  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Los coeficientes de determinación  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_1^2$ ,  $X_1X_2$ ,  $X_1X_3$  del modelo de segundo orden para el diseño central compuesto con 3 factores fueron diferentes de cero.

---

## ANEXO 6. PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

### PUBLICACIONES

G. Saucedo-Castañeda, G. Viniegra-González, E. Favela-Torres, **M. T. Torres-Mancera**, A. Figueroa-Montero. Sistema de respirometría con administración remota para el monitoreo en línea de la concentración de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> y flujo de los gases de salida en procesos biológicos. **Patente en trámite.**

**M.T. Torres-Mancera**, I. Baqueiro-Peña, E. A. Figueroa-Montero, G. Rodríguez-Serrano, E. González-Zamora, E. Favela-Torres, G. Saucedo-Castañeda, 2012. Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. Aceptado para ser publicado en *Biotechnol. Progress*.

**M. T. Torres-Mancera**, J. Córdova-López, G. Rodríguez-Serrano, S. Roussos, Ma. A. Ramírez-Coronel, E. Favela-Torres and G. Saucedo-Castañeda, 2011. Enzymatic extraction of hidroxicinnamic acids from coffee pulp. *Food Technol. Biotechnol.* 49 (3) 369-373.

M. A. Arellano-González, Ma. A. Ramírez-Coronel, **M. T. Torres-Mancera**, G. G. Pérez-Morales and G. Saucedo-Castañeda, 2011. Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (*Coffea Arabica*) pulp extracts. *Food Technol. Biotechnol.* 49 (3) 374-378.

### CONGRESOS

*Biotechnological potential of coffee pulp in the obtention of high added value products.* 17 ème Congrès des Doctorants en Science de l'Environnement. Casis, Francia del 29 al 30 Abr, 2010.

*Obtention of high value products from coffee pulp.* Journées de Doctorants. Faculté des Sciences des San Jerômé, Univ. Paul Cezànee. Marsella, Francia del 21 al 22 Jun, 2010.

*Direct quantification of pectinase, xylanase and cellulose activities in Petri dishes assay.*

7th SER European Conference on Restoration Ecology. Palacio del Papa Aviñón, Francia del 23 al 27 Ago, 2010.

*Enzymatic extraction of hidroxicinnamic acids from coffee pulp.* 4º International Congress on Bioprocesses in Food Industries. CIETEP Curitiba, Brasil del 5 al 8 de Oct, 2010.

*Release of antioxidant from coffee pulp by enzymatic extracts produced by solid state fermentation.* 4° International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. World Trace Center de Boca del Rio Veracruz, México del 29 Nov al 1 Dic, 2010.

*Selección de hongos filamentosos para la extracción de ácidos hidroxicinámicos en la pulpa de café por fermentación.* XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Juriquilla Querétaro, México del 19 al 24 de Jun, 2011.

*Diseño experimental tipo Plackett-Burman aplicado a la producción de pectinasas, xilanasas y celulasas por fermentación en medio sólido.* XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Juriquilla Querétaro, México del 19 al 24 de Jun, 2011.

*Transformation of chlorogenic acid by filamentous fungi for the obtention of high value products.* V International Congress on Food Science and Food Biotechnology in Developing Countries. Nuevo Vallarta, México del 24 al 26 Oct, 2012.

*Mixture design and response surface methodology for improving enzymatic extraction of chlorogenic acid.* XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y 12 th International symposium on the genetics of industrial microorganisms. Cancún, México del 23 al 28 Jun, 2013.

*Direct Quantification of cellulose activity by clearing zones on Peri dishes assay.* XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y 12 th International symposium on the genetics of industrial microorganisms. Cancún, México del 23 al 28 Jun, 2013.

*Optimization of solid-state culture media for production of enzyme extract suitable for chlorogenic acid extraction.* XV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y 12 th International symposium on the genetics of industrial microorganisms. Cancún, México del 23 al 28 Jun, 2013.

# Biotransformation and Improved Enzymatic Extraction of Chlorogenic Acid from Coffee Pulp by Filamentous Fungi

**María Teresa Torres-Mancera**

Dept. of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, DF Mexico

**Itzamná Baqueiro-Peña**

Dept. of Chemistry Engineering, Food and Environment, University of Americas Cholula, Puebla 72820, DF Mexico

**Arturo Figueroa-Montero**

Dept. of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, DF Mexico

**Gabriela Rodríguez-Serrano**

Dept. of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, DF Mexico

**Eduardo González-Zamora**

Dept. of Chemistry, Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, DF Mexico

**Ernesto Favela-Torres**

Dept. of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, DF Mexico

**Gerardo Saucedo-Castañeda**

Dept. of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa Campus. Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, CP 09340, DF Mexico

DOI 10.1002/btpr.1696

Published online Month 00, 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

*The highest enzymatic extraction of covalent linked chlorogenic (36.1%) and caffeic (CA) (33%) acids from coffee pulp (CP) was achieved by solid-state fermentation with a mixture of three enzymatic extracts produced by *Aspergillus tamaris*, *Rhizomucor pusillus*, and *Trametes sp.* Enzyme extracts were produced in a practical inexpensive way. Synergistic effects on the extraction yield were observed when more than one enzyme extract was used. In addition, biotransformation of chlorogenic acid (ChA) by *Aspergillus niger* C23308 was studied. Equimolar transformation of ChA into CA and quinic acids (QA) was observed during the first 36 h in submerged culture. Subsequently, after 36 h, equimolar transformation of CA into protocatechuic acid was observed; this pathway is being reported for the first time for *A. niger*. QA was used as a carbon source by *A. niger* C23308. This study presents the potential of using CP to produce enzymes and compounds such as ChA with biological activities. © 2013 American Institute of Chemical Engineers *Biotechnol. Prog.*, 000:000–000, 2013*

*Keywords: chlorogenic acid, caffeic acid, biotransformation, enzymatic extraction, solid-state fermentation*

## Introduction

The hydroxycinnamic acids (HA) ferulic, caffeic (CA), *p*-coumaric, and sinapic exhibit anticarcinogenic, anti-inflammatory, and antioxidant properties. Chlorogenic acids (ChA) belong to a family of esters formed by HA and quinic acid (QA); the most common, ChA, or 5-*O*-caffeoyl QA, is an ester formed between CA and QA.<sup>1</sup>

Recently, the number of studies on the chemical composition of coffee pulp (CP) has been increasing, due to their potential use to obtain high value-added products. This is important in coffee producer countries, where waste disposal presents a risk of important pollution problems.<sup>2</sup> The concentrations of ChA and CA in CP are high, up to 3,097 and 1,985 mg kg<sup>-1</sup>, respectively.<sup>3</sup> CP production in Mexico in 2008 was estimated at 707.35 million dry tons of CP generated from coffee cherries processed by the so-called wet method.<sup>4</sup> As an agro-industrial by-product, CP is of special interest because of its potential industrial applications. In

Correspondence concerning this article should be addressed to G. Saucedo-Castañeda at saucedo@xanum.uam.mx

particular, we have developed a new approach to extract and produce antioxidants like ChA and CA which should be of great interest for the food, pharmaceutical, and cosmetology industries.<sup>3,4</sup>

CA possesses strong in vitro antioxidant properties involving multiple mechanisms of free radical scavenging, metal ion quenching, and inhibitory effects on specific enzymes responsible for free radical and hydrogen peroxide formation. CA can be used as a precursor in the manufacture of anticarcinogenic, antioxidant, and immunomodulatory drug agents.<sup>5</sup> Kikuzaki et al.<sup>6</sup> demonstrated that CA has a higher 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity (49.6%) than  $\alpha$ -tocopherol (41.8%), sinapic acid (33.2%), butylated hydroxytoluene (29.2%), ferulic acid (27.3%), or *p*-coumaric acid (7%). CA is a widely used synthetic antioxidant in the food industry, indicating the interest production of the CA. Arellano-González et al.<sup>7</sup> showed that the antiradical activity of fermented CP (FCP) was higher than that obtained using non-FCP. This behavior may be due to the presence of free HA.

ChA and CA are covalently linked to polysaccharides (arabinoxylans, xyloglucans, and pectins) through ester linkages. ChA is commonly extracted by conventional methods using organic solvents (chloroform, dichloromethane), which are dangerous to handle and harmful to human health and the environment. Extraction of ChA by supercritical CO<sub>2</sub> is strongly dependent on the solubility of low-molecular-weight substances in supercritical fluids. The solubility of ChA is expected to be low, particularly as the molecular weight of its HA-linked partner increases.<sup>8</sup> By contrast, enzymatic extraction of ChA and CA can be used for the production of "natural products."<sup>9</sup> Feruloyl esterases (FAE, also known as ferulic acid esterases, cinnamoyl esterases, and cinamic acid hydrolases, EC 3.1.1.73) are subclasses of carboxylic acid esterases that have been found to cleave the ester linkage between HA and plant cell wall polysaccharides.<sup>10</sup>

In a previous work, we studied the enzymatic extraction of HA by a commercial pectinase and enzyme extract produced by *Rhizomucor pusillus* in solid-state fermentation (SSF) using olive oil and CP as an inducer of the FAE. The FAE activity obtained in the fermentation using CP as an inducer was 31.8% higher in comparison with that obtained in the fermentation using olive oil as inducer. The highest yield of extraction of HA was obtained by mixing the produced enzyme extract using CP and commercial pectinase. Extraction yields were as follows (%): ChA 54.4, ferulic acid 19.8, *p*-coumaric acid 7.2, and CA 2.3. We considered that the enzymatic extraction of ChA and CA could improve using a mixture enzyme extracts produced by different filamentous fungus by SSF. The presence of different depolymerizing activities has a positive effect on the degradation of cell wall of the CP allowing the release of the esterified ChA and CA.<sup>3,11</sup> It showed that the mixing enzyme extracts exhibit both esterifying and depolymerizing activities, which could be responsible for the increase in the extraction yield of HA. CP could be revalued as a source for extraction of ChA, a high added value product. In this work, we studied the improved extraction of ChA and CA via enzymatic extracts produced by *Trametes* sp., *R. pusillus* (strain 23aIV), and *Aspergillus tamaraii* (strain V12307) by SSF. In addition, biotransformation of ChA into CA by *Aspergillus niger* C23308 was carried out in submerged culture.

## Material and Methods

### Fungal strains and conservation

Three fungal strains were used to generate the enzymatic extracts: *Trametes* sp., *R. pusillus* (strain 23aIV), and *A. tamaraii* (strain V12307). Biotransformation of ChA was carried out by *Aspergillus niger* (strain C23308). *R. pusillus* (strain 23aIV) was kindly donated by Dr. Jesús Córdova López from the University of Guadalajara, México. All other strains belong to the Institute of Research for Development (France) or the microorganism collection of the Metropolitan Autonomous University (Mexico). The fungal strains were maintained on potato dextrose agar (PDA) at 4°C.

### Inoculum preparation for SSF

The inoculum was prepared by culturing the strains in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of PDA. Incubation was carried out at 30°C for 5 days. Spores were harvested with 30 mL of a Tween 80 solution (0.01%) and recovered using a magnetic stirrer. Spores were counted using a Neubauer hemocytometer (Blaubrand, Germany).

### Inoculum preparation for ChA biotransformation

Spore suspensions of *Aspergillus niger* (C23308) were obtained from cultures incubated at 30°C for 4 days h in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of PDA. Spores were harvested with 10 mL of a Tween 80 solution (0.01%) and recovered with a magnetic stirrer. The spores were counted using a Neubauer hemocytometer (Blaubrand, Germany), and the inoculum concentration was adjusted at  $1 \times 10^7$  spores mL<sup>-1</sup>.<sup>12</sup>

### Agro-industrial substrate

CP was obtained from a commercial cooperative enterprise, Beneficios de Café (Veracruz, México). CP was dried at 60°C for 24 h until it reached a moisture content close to 5% and it was ground and sieved (meshes no. 16 and 20). It was store in dark plastic bags at room temperature. Before fermentation, distilled water was added to CP to reach a moisture content of 30%, and then it was autoclaved for 10 min at 15 psi.<sup>3</sup>

### Solid-state fermentation

CP was impregnated with liquid medium. The composition of liquid medium was as follows in g per 100 g of CP (dry mass): 12.3, diammonium tartrate; 3.4, yeast extract; 1.3, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.09, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 3.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; and 16.7, maltose.<sup>4</sup> The CP and nutrients were autoclaved for 10 min at 15 psi at humidity of 35%. Then the inoculum and water were added to reach a final concentration of  $1 \times 10^8$  spores g<sup>-1</sup> of dry substrate and a humidity of 60%. Glass columns (20 × 2.5 cm) were packed with 15 g of the inoculated CP and incubated in a water bath at 30°C (*A. tamaraii*), 37°C (*Trametes* sp.), or 40°C (*R. pusillus*). Air was supplied through the bottom of the column at rate of 1.5 mL g<sup>-1</sup> of wet material. Fungal growth was monitored continuously online by CO<sub>2</sub> production.<sup>13</sup> Results were expressed as mg of CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> of initial dry matter (IDM) per hour. The Gompertz model was used to describe the growth of the filamentous fungi.<sup>14</sup> Samples were analyzed in duplicate for pH, moisture content (Moisture Determination Balance, OHAUS,

Model MB35), water activity (Aqualab Model CX-2, Washington), and FAE activity (see Enzyme assay section).

### Submerged culture for ChA biotransformation

Fermentations were carried out in 35-mL glass bottles containing 10 mL of culture broth. Culture medium was previously reported by Baqueiro-Peña et al.<sup>12</sup> The composition was as follows (g L<sup>-1</sup>): 3, sucrose; 3, yeast extract; 3, NaNO<sub>3</sub>; 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.5, MgSO<sub>4</sub>; and 0.5 KCl. ChA (Sigma-Aldrich) was first diluted in methanol and filtered through a 0.20-μm Millipore membrane, and added in the culture medium to reach a final concentration of 800 mg L<sup>-1</sup>. Cultures were incubated at 30°C for 120 h at 100 rpm in duplicate. Samples were taken every 12 h in duplicate; mycelia were removed by filtration and then the biomass was quantified by gravimetry (dry weight). Control cultures assays were performed without inoculum. Aliquots were analyzed for ChA, CA, protocatechuic acid (PA), glucose, fructose, sucrose concentrations, and pH.

The molar ratio yield ( $Y_{CA/ChA}$ ) of CA production to ChA consumption was expressed as follows:

$$Y_{CA/ChA} = \frac{CA_f - CA_i}{ChA_i - ChA_f}$$

where  $CA_f$  and  $CA_i$  are the final and initial concentrations of the CA product, respectively;  $ChA_i$  and  $ChA_f$  are the initial and final molar concentrations of ChA, respectively.

ChA conversion (%) was expressed as follows:

$$ChA(\%) = \frac{ChA_i - ChA_f}{ChA_i} \times 100$$

### Enzymatic extraction and recovery

Upon termination of the solid-state cultures, the fermented solids were dried with dry air at a flow rate of 10 L min<sup>-1</sup> at 30°C until the final moisture content was less than 2%. FAE enzymatic extracts were obtained after addition of 30 mL of 50 mM citrate buffer, pH 6, to 5 g of fermented dry material. The mixture was stirred by vortexing for 5 min and centrifuged at 5,000 rpm for 15 min in a Beckman Coulter centrifuge (Allegra<sup>TH</sup> 25R Centrifuge) at 4°C. The enzymatic extracts were stored at 4°C until use.

### Enzyme assay

FAE activity was measured using a titrimetric technique according to Torres-Mancera et al.<sup>3</sup> The reaction was performed in a mixture of methyl ferulate (Extrasynthese Lyon, France) 4.5 mM and blended with the enzyme extract in a proportion 12:1 (v:v) at 45°C, pH 6 for 15 min. The volume of NaOH added to maintain pH 6 constant was registered continuously for 20 min using a Mettler DL21 Titrator. Activities were expressed in enzyme units (U). One Unit (1-U) was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol of product per minute under the conditions of the assay.

### Enzymatic extraction of ChA and CA present in CP

The CP was pretreated with a solution methanol–water (80:20, v:v %) for extracting the free ChA and CA.<sup>3</sup> Enzymatic extraction of ChA and CA from CP without free ChA and CA was performed as follows: dry CP (10 g) was mixed with 90 mL of citrate buffer (50 mM, pH 6) and 10 mL of

Table 1. Enzymatic Treatments

Enzyme Extracts	Treatments							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Enzyme extract from <i>R. pusillus</i>	X			X	X		X	X
Enzyme extract from <i>A. tamarii</i>		X		X		X	X	X
Enzyme extract from <i>Trametes</i> sp.			X		X	X	X	X
Commercial pectinase								X
Total U of FAE used	10	10	10	20	20	20	30	40

enzyme extract. The CP and citrate buffer were autoclaved for 10 min at 15 psi. FAE activity was measured (see Enzyme assay section) of each enzymatic extract assay produced by SSF by *A. tamarii*, *Trametes* sp., and *R. pusillus*, and then the volume was adjusted to be at 10 U of FAE in the reaction. The enzymatic extraction was performed in darkness at 30 and 40°C under continuous stirring (100 rpm). Samples were taken at 0, 3, 6, 8, and 12 h of the reaction. The reaction volume was added of 0.02% (wt:v) Cephalosporin (J.T. Baker, México). The selective extraction of ChA and CA were carried out with ethyl acetate at a sample ratio of 1:1 (v:v).

Seven enzymatic treatments were performed as indicated in Table 1. Treatments A, B, and C were enzymatic extractions performed using enzyme extracts individually produced by SSF. Treatments D, E, and F were enzymatic extractions carried out using two enzyme extracts. Treatment G was an enzymatic extraction assay using a mixture of three enzyme extracts. Treatment H was combined with (10 U FAE) commercial pectinase (Treatment H).<sup>3</sup>

Concentrations of extracted ChA and CA were determined by HPLC (see below) and expressed as mg per kg of CP. The extraction yield of ChA and CA was expressed as percentage released regarding the ChA and CA covalently bonded to the CP cell wall.

### Sugar analysis (sucrose, glucose, fructose)

Sugar concentrations were determined by HPLC as described in Tovar-Castro et al.<sup>15</sup> using a Perkin-Elmer LC250 HPLC equipped with a Binary LC Pump, with a 20-μL loop and a Perkin-Elmer refraction index detector. A Resex 300-mm column (Phenomenex), 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was used as the mobile phase at 0.5 mL min<sup>-1</sup>, and column temperature was kept at 40°C.

### ChA and CA analysis in CP assays

The free and total content of ChA and CA were determined by HPLC according to Torres-Mancera et al.<sup>3</sup> HPLC analysis was performed using a Perkin-Elmer LC250 Binary LC Pump, coupled with a variable UV/visible detector. A Varian Polaris 5 Amide C-18 reversed phase column (200 × 4.6 mm) at 36°C and with a mobile phase at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup> by gradient elution was used. The mobile phase was a mixture of two solvents: solvent A, an aqueous solution of acetic acid (0.5%) and solvent B, methanol.

### Analysis of the biotransformation products of ChA

Aliquots were analyzed using a Shimadzu quaternary pump Liquid Chromatograph LC20A equipped with a diode

array detector SPD M20A. A Polaris 5 Amide C18 Varian ( $4.6 \times 200$  mm) column was used. The mobile phase contained solution of water: methanol: acetic acid (64:35:1) as reported by Barghini et al.<sup>16</sup> The flow rate was  $1 \text{ mL min}^{-1}$ .

### Water activity

The water activity was measured in duplicate using an AquaLab CX-2, Labsen Scientific equipment. The principle of the method is the formation of the dewdrops in a mirror. The equipment was calibrated with distilled water by adjusting the value of  $a_w$  equal 1, at room temperature.

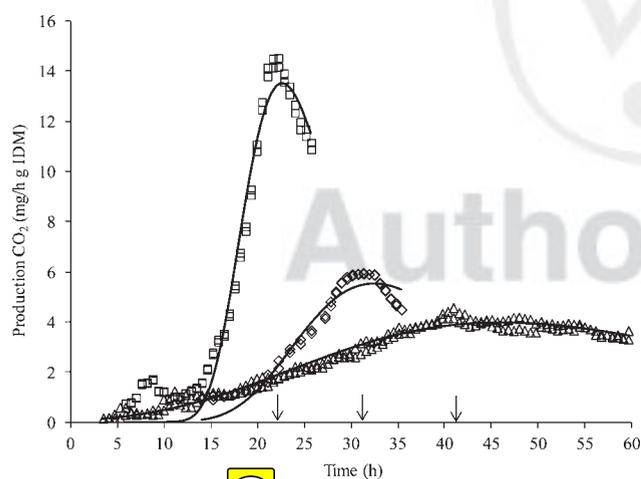
### Protein analysis

Protein concentration was determined in the enzymatic extracts (see Enzymatic extraction and recovery section) produced by SSF by *A. tamarii*, *Trametes* sp., and *R. pusillus* according to Lowry et al.<sup>17</sup>

## Results and Discussion

### Enzyme production by SSF

FAE activities were produced by three strains of filamentous fungi by SSF using CP as the sole carbon source and inducer. In order to enhance FAE production and obtain the enzymatic extracts without proteases, the CP was supplemented with a mineral medium (see Material and Methods section on SSF) and fermentations were halted once they



**Figure 1.**  $\text{CO}_2$  production rates ( $\text{mg CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g IDM}^{-1}$ ) by *A. tamarii* (□), *R. pusillus* (◇), and *Trametes* sp. (Δ). The continuous line is the fit of the observed data to the Gompertz model. The enzyme extracts were obtained from the dried fermented solid material, collected at the point when the maximum CPR (arrows) was reached for each strain.

attained their maximum  $\text{CO}_2$  production rate (CPR). In previous studies we had demonstrated that maximum FAE activity correlates well with maximum CPR.<sup>3,4,8</sup> Figure 1 shows the CPR of *R. pusillus*, *Trametes* sp., and *A. tamarii*.

The culture of *A. tamarii* showed a first peak in CPR at 9 h of fermentation. Oriol et al.<sup>19</sup> showed that in SSF by *A. niger*, the first peak of CPR could be associated with a transitional phase between germination and apical growth. This behavior has been observed only in *Aspergillus* strains.

The maximum value of CPR for *A. tamarii* was obtained after 22 h of fermentation. The maximum values of CPR for *R. pusillus* and *Trametes* sp. were observed at 31 and 41 h, respectively. These values were 3.3 and 2.4 times higher than the CPR found for *Trametes* sp. and *R. pusillus*, respectively. The total amounts of  $\text{CO}_2$  produced were 254.9, 180.6, and 140.5  $\text{mg CO}_2 \text{ g IDM}^{-1}$  for *Trametes* sp. (59 h), *A. tamarii* (26 h), and *R. pusillus* (35 h), respectively.

The IDM losses (IDML) measured by gravimetry were 18.2, 12.7, and 10.1% for *Trametes* sp., *A. tamarii*, and *R. pusillus*, respectively. The IDML estimated by  $\text{CO}_2$  production from hexoses were 17.3, 12.3, and 9.5%, respectively. The total amount of  $\text{CO}_2$  produced can be used to estimate the equivalent of hexoses consumed from CP using the theoretical equation of oxidation of glucose. These values can be compared with the IDML. The variation between the IDML measured by gravimetry and IDML-estimated  $\text{CO}_2$  production could be explained because biomass and product generation are not considered in  $\text{CO}_2$  formation.

Respiratory activity ( $\mu_{\text{CO}_2}$ ) was estimated through  $\text{CO}_2$  measurement using the Gompertz model. Goodness of fit to the Gompertz model was estimated by the  $R^2$  coefficients, which were 0.96, 0.97, and 0.98 for the CPR profiles for *R. pusillus*, *Trametes* sp., and *A. tamarii*, respectively.

The  $\mu_{\text{CO}_2}$  is often used for indirect estimations of growth of filamentous fungi.<sup>13</sup> Respiratory activities of 0.20, 0.11, and  $0.04 \text{ h}^{-1}$  were obtained for *A. tamarii*, *R. pusillus*, and *Trametes* sp., respectively.

FAE activity found in the enzyme extract from *A. tamarii* was 2.8- and 1.5-fold higher than those found in the extracts from *R. pusillus* and *Trametes* sp., respectively (Table 2). The FAE activities found in the three enzymatic extracts were higher than those previously reported by Asther et al.<sup>20</sup> and Ramírez et al.<sup>21</sup> and lower than reported by Hegde et al.,<sup>22</sup> while the FAE activity reported by Bartolomé et al.<sup>23</sup> was similar to the FAE activities of *R. pusillus* and *A. tamarii*.

Moisture content and water activity remained nearly constant (59% and 0.997, respectively) during SSF of CP by the strains used in this work. The initial pH of the culture medium was adjusted to 7.0; by the end of fermentation the pH was 6.8, 6.2 and 6.0 for *Trametes* sp., *R. pusillus*, and *A. tamarii*, respectively. The decreases in pH might be

**Table 2.** FAE Activity Produced by Different Strains With Different Substrates by SSF

Strain	FAE Activity ( $\text{U g}^{-1} \text{ DM}$ )	Substrate	References
<i>A. tamarii</i>	$20.6 \pm 0.10^*$	Coffee pulp	This work
<i>R. pusillus</i>	$13.5 \pm 0.05^*$	Coffee pulp	This work
<i>Trametes</i> sp.	$7.8 \pm 0.10^*$	Coffee pulp	This work
<i>Rhizopus</i> sp. (C16)	1	Coffee pulp	Ramírez et al. <sup>19</sup>
<i>A. niger</i>	32.5	Wheat bran	Hegde et al. <sup>20</sup>
<i>A. niger</i>	0.8	Sugar beet pulp	Asther et al. <sup>17</sup>
<i>A. niger</i> (CFR1105)	10.8	Wheat	Bartolomé et al. <sup>24</sup>

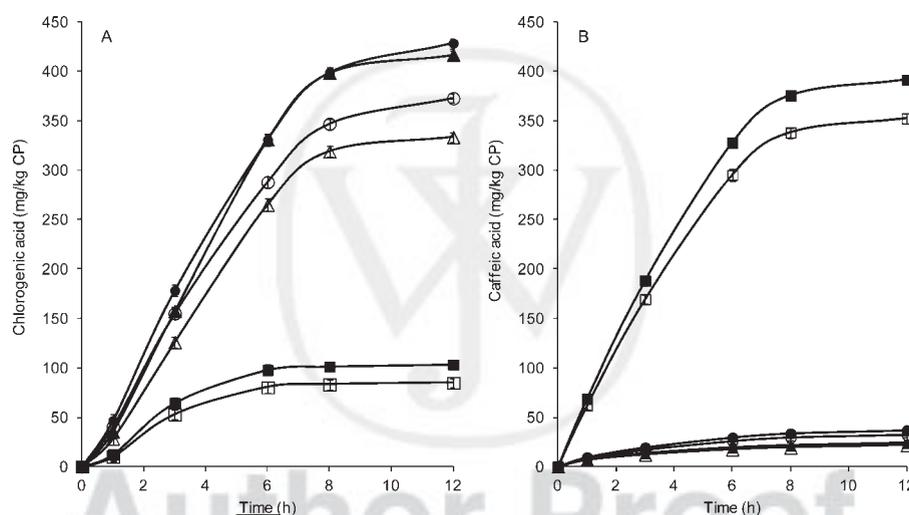
\*Data are means of triplicate analyses.

**Table 3. Amounts of ChA and CA Extracted and Extraction Yields Produced From Coffee Pulp Using Different Enzyme Extracts**

Enzyme Extracts	Treatment	Units	Chlorogenic Acid	Caffeic Acid
<i>R. pusillus</i> *	A	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	331.0 ± 5.7 13.9	19.2 ± 2.4 1.0
<i>A. tamarii</i>	B	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	97.8 ± 5.3 4.1	327.8 ± 2.3 17.5
<i>Trametes</i> sp.	C	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	330.8 ± 4.6 13.9	29.4 ± 2.2 1.6
<i>R. pusillus</i> and <i>A. tamarii</i>	D	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	483.0 ± 3.5 20.3	564.1 ± 2.2 30.1
<i>R. pusillus</i> and <i>Trametes</i> sp.	E	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	905.3 ± 4.2 38.0	56.7 ± 2.7 3.0
<i>A. tamarii</i> and <i>Trametes</i> sp.	F	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	318.6 ± 3.2 13.4	440.6 ± 1.5 23.5
<i>R. pusillus</i> , <i>A. tamarii</i> and <i>Trametes</i> sp.	G	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	860.3 ± 4.5 36.1	618.5 ± 2.8 33.0
Commercial pectinase, <i>R. pusillus</i> , <i>A. tamarii</i> and <i>Trametes</i> sp.	H	(mg kg <sup>-1</sup> ) (%)	1,627.5 ± 5.3 68.3	715.5 ± 3.7 38.2

Data are means of triplicate analyses. Treatments were as indicated in Table 1. Extraction yield (%) corresponded to the ChA and CA covalently bonded to the cell wall of CP.

\*Results obtained in a previous work.<sup>3</sup>



**Figure 2.** Enzymatic extraction for enzyme extracts produced by *R. pusillus* at 30°C (Δ) and 40°C (▲), *Trametes* sp. at 30°C (○) and 40°C (●), and *A. tamarii* at 30°C (◻) and 40°C (■) by SSF. A: ChA and B: CA.

due to the production of organic acids and/or the release of phenolic acids.

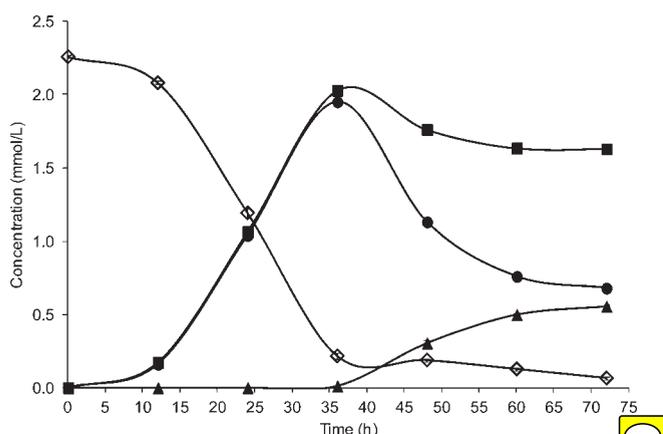
### Enzymatic extraction of ChA and CA

In previous studies,<sup>3</sup> the content of esterified ChA and CA in the CP used in this work was  $2,382.8 \pm 4.5$  and  $1,873.1 \pm 4.5$  mg kg<sup>-1</sup>, respectively. Seven enzymatic treatments (Table 1) were used to evaluate for extraction of the esterified ChA and CA (Table 3). The enzymatic extraction of ChA and CA is shown in Figure 2. It can be observed that between 0 and 8 h, there was a linear increase in the amount release of ChA and CA covalently bonded. No significant increase ( $\alpha < 0.001$ ) was observed for the ChA and CA amount between 8 and 12 h. It was observed that an increase of temperature from 30 to 40°C improved by 20% the release of ChA and CA (Figure 2). To compare the results with previous work, the assay conditions for the enzymatic extraction of ChA and CA were 40°C for 6 h at 100 rpm.<sup>3</sup>

The selective recovery of ChA and CA depended on the extract used in treatments A, B, and C. Extracts from

*R. pusillus* and *Trametes* sp. allowed greater extraction of ChA than CA. In contrast, the extract produced by *A. tamarii* enabled greater extraction of CA than ChA (Table 3 and Figure 2). Crepin et al.<sup>24</sup> classified FAE into four types, depending on their ability to release ferulic, CA, sinapic, and *p*-coumaric acids. The results obtained might be due to differences in the types of FAE in the enzymatic extracts having different innate capacities to extract ChA and CA esterified to the cell walls of the CP. Further studies as a SDS page or another type of analysis should be carried out to verify the presence of different types of FAE in the enzymatic extracts.

Treatments D, E, and F were enzymatic extractions using a combination of two enzyme extracts produced by *R. pusillus*, *Trametes* sp., and *A. tamarii*. Simultaneous use of the enzymatic extracts produced by *R. pusillus* and *Trametes* sp. (Treatment E) enabled the highest ChA extraction level, but with a considerably lower extraction of CA. The combination of enzyme extracts from *R. pusillus* and *A. tamarii* (Treatment D) allowed for greater extraction of CA than treatments E and F (Table 3). The ChA extraction yield (38%) obtained in this work using treatment E (extracts of



**Figure 3. Biotransformation of ChA ( $\diamond$ ) to CA ( $\blacksquare$ ), QA ( $\bullet$ ), and PA ( $\blacktriangle$ ) by *A. niger* C23308.**

*Trametes* sp. and *R. pusillus*) was similar the extraction yield obtained in previous work (39.5%)<sup>3</sup> using only a commercial pectinase extract (10 U FAE measured). While the extraction yield of CA (3%) obtained in this work using treatment E was higher than the extraction yield of CA obtained in previous work (1.8%)<sup>3</sup> using only a commercial pectinase. The conditions of extraction in previous work were 40°C, 6 h, 100 rpm.

Treatment G was an enzymatic extraction using a mixture of three enzyme extracts produced by *R. pusillus*, *Trametes* sp., and *A. tamaritii*. Enzymatic extraction of CA with treatment G was higher than in the others treatments. While, the enzymatic extraction of ChA with treatment E was higher than with the treatment G. The best combined extraction of ChA and CA was obtained when the three enzymatic extracts produced by *R. pusillus*, *Trametes* sp., and *A. tamaritii* were used (Treatment G). A synergistic effect was observed in extraction yield when either two or three enzyme extracts were used; the extraction yield was higher than the arithmetic addition of the extracts used.

The enzymatic extraction of ChA in a previous work<sup>3</sup> was 54.4%, using a mixture of commercial pectinase extract together with an enzymatic extract produced by *R. pusillus*. This result was 1.43 times higher to that obtained in this work using a mixture of three enzymatic extracts (Treatment G). The improvement in extraction efficiency might be due to the presence of partially purified depolymerizing commercial enzymes (pectinase) that degraded the pectin of the cell walls thereby allowing for esterases to reach and hydrolyze the ester bonds between ChA and L-arabinose or D-galactose. The extraction yield of CA in this work using the mixture of three enzymatic extracts (Treatment G) was 4.6 times higher than that obtained in other previous work.<sup>3</sup> This is probably due to the presence of FAE (Types B, C, and D) that have the ability to release esterified CA from the cell walls of CP (Table 3). This result could be increased 15% according to Figure 2 by increasing the extraction time to 8 h.

Table 3 shows that the enzymatic extraction of ChA and CA using treatment H were 1.9 and 1.2 times higher compared to that the obtained with the treatment G. We observe a positive effect on the extraction of esterified ChA and CA when incorporating commercial pectinase to the mixture of enzyme extracts produced by *R. pusillus*, *Trametes* sp., and *A. tamaritii*. The enzymatic extraction of ChA and CA using treatment H were 1.26 and 5.31 times higher compared to

**Table 4. ChA Conversion and Molar Ratio Yields**

Time (h)	ChA (%)	$Y_{CA/ChA}$	$Y_{QA/ChA}$	$Y_{PA/CA}$
0	0	0	0	0
12	7.85	0.98	0.90	0
24	47.21	1.00	0.98	0
36	90.37	0.99	0.96	0.98
48	91.61	0.85	0.55	0.99
60	94.29	0.77	0.36	1.00
72	97.07	0.74	0.31	0.99

Data are means of duplicate analyses.

that the obtained in previous work.<sup>3</sup> The highest extraction of esterified ChA (68.3%) and CA (38.2%) was achieved with a mixture of the three enzymatic extracts produced by SSF of CP in combination with an extract of commercial pectinase. It should be kept in mind that the enzyme extracts were obtained in a simple way; the fermenting solids were dried and then a buffer was used to obtain the enzyme extract. No further downstream processing was applied to the crude enzyme extract.

#### ChA biotransformation in submerged culture

Once the ChA was extracted from the CP, the biotransformation of ChA to CA was evaluated. The aim of this biotechnological approach is to develop a new strategy to produce valuable products from agro-industrial residues frequently considered as wastes. Abiotic control assays indicated that no significant changes in ChA concentration were observed at 120 h incubation (data not shown). In the case of inoculated assays, the ChA was hydrolyzed (90.4%) during the first 36 h of incubation, yielding CA and QA in an equimolar ratio (Figure 3 and Table 4). Equimolar formation of CA and QA has been previously reported by Clifford.<sup>1</sup> After that, CA is partially transformed to PA and QA is partially assimilated by *A. niger* C23308 (Figure 3).

Between 36 and 72 h of culture, the CA concentration decreased to 26% of its initial total concentration produced by the biotransformation of ChA. This can be explained by biotransformation leading to PA formation, which is more easily assimilated by the microorganism than CA. PA concentration increased from 36 to 72 h (Figure 3), while QA concentration decreased 69%. Figure 3 showed that the decrease of the concentration of CA is less than the increase of the concentration of PA. This could be explained because when the CA starts the biotransformation to PA (36 h), the ChA has not completely biotransformed to CA. The 9.63% ChA unhydrolyzed was biotransformed to CA between 36 and 72 h. This may explain because the CA does not decrease at the same proportion that PA increases. The ChA was biotransformed more quickly to CA than CA was to PA.

The decline in QA concentration could be explained because it was used as carbon source by *A. niger* C23308; this will be discussed later. During the same period of time, the molar yields of  $Y_{CA/ChA}$  and  $Y_{QA/ChA}$  decreased while the molar yield of  $Y_{PA/CA}$  was 1 (Table 4). CA was biotransformed, in a molar yield close to 1, to PA (Table 4). The presence of PA in the broth was analyzed spectroscopically and compared against a PA standard.

The biotransformation of CA into PA could be explained by two different pathways: (i) CA is transformed by caffeoyl-CoA synthetase to caffeoyl-CoA; then enoyl-CoA hydratase and the hydrogenase transform the caffeoyl-CoA to PA.<sup>25</sup> The mechanism of decarboxylation of CA into PA

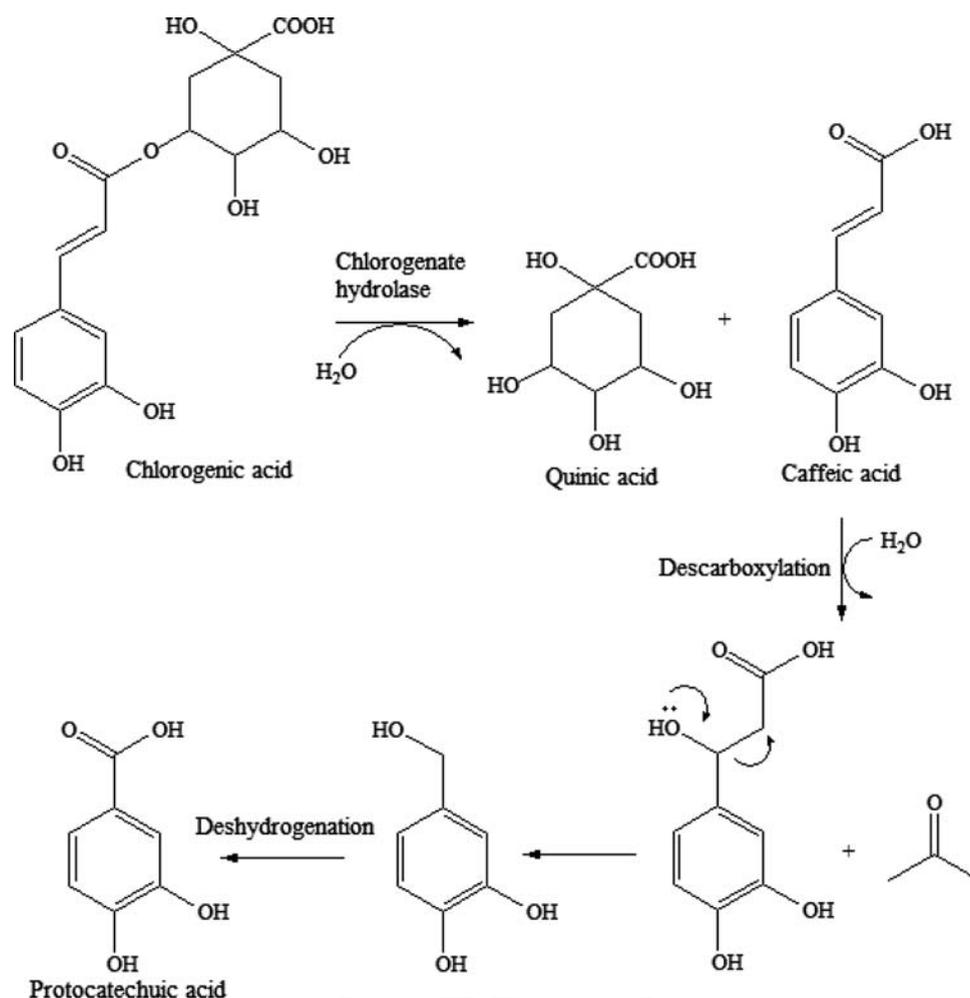


Figure 4. Proposed ChA biotransformation pathway by strain *A. niger* C23308.

has been studied in *Acinetobacter* sp. ADP1 by Smith et al.<sup>26</sup> They demonstrated that PA can be generated from CA, subsequent to hydrolysis of ChA, and also showed that chlorogenate hydrolase is associated with the cell membrane; (ii) CA can be transformed to *p*-coumaric acid (*p*CA); then, after decarboxylation of the *p*CA, it is transformed to PA. The mechanism of transformation of *p*CA to PA has been reported by Estrada-Alvarado et al.<sup>27</sup> and Torres y Torres and Rosazza,<sup>28</sup> in *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533 and *B. megaterium*, respectively. In the present work, *p*CA was not detected during the process of ChA biotransformation by *A. niger*. This suggests that biotransformation of ChA by *A. niger* C23308 occurs through its hydrolysis into CA and QA; CA is then biotransformed to PA as shown in Figure 4.

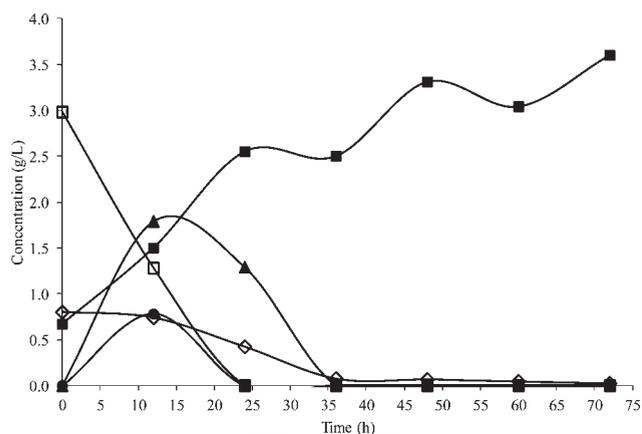
PA can be used as a carbon source by some microorganisms. Tack et al.<sup>29</sup> and Sparnins and Dagley<sup>30</sup> demonstrated the use of gallic acid and PA as carbon sources by strains of *Pseudomonas*. *P. putida* can transform PA into acetyl CoA and succinate. *P. testosterone* can transform PA into pyruvic acid. Crawford<sup>31</sup> and Gurujeyalakshmi and Mahadevan<sup>32</sup> showed the growth of *Bacillus* sp. using PA as carbon source. PA was degraded to 2-hydroxybenzoic semialdehyde in a reaction involving meta-fission between C2 and C3 of the benzene nucleus; the 2-hydroxybenzoic semialdehyde was then degraded to pyruvate and acetaldehyde by enzymatic reactions. All the final products can be incorporated into the metabolic pathway.

In the case of the genus *Aspergillus*, several studies have described ChA hydrolase for the production of CA and QA.<sup>5,33,34</sup> The *A. niger* studies did not mention other compounds formed during the hydrolysis of ChA. In this article, the production of PA from CA as a product of the hydrolysis of ChA is reported for the first time.

In this study, *A. niger* C23308 showed the ability to biotransform ChA to CA and QA. CA has a strong antioxidant capacity, stronger than butylhydroxytoluene (BHT), a compound widely used in the food industry.<sup>6</sup> A study supporting these findings was published by Gülçin,<sup>35</sup> using different concentrations of CA. Significant differences ( $\alpha = 0.01$ ) in antioxidant capacity were found as follows: CA > BHA > BHT. CA can be used in the synthesis of anticarcinogenic, antioxidant, and immunomodulatory drugs. QA is utilized as an enantiomerically pure starting material for the synthesis of various molecules, including the synthesis of so-called compound FK-506, an immunosuppressive agent useful in preventing organ transplant rejection.<sup>36</sup>

#### Evolution of biomass and sugars during ChA biotransformation

During the biotransformation of ChA, the production of biomass and consumption of sucrose, glucose, fructose, and ChA by *A. niger* C23308 were evaluated (Figure 5). Sugar analyses showed that during the first 12 h of cultivation, the sucrose hydrolysis rate was higher than those for glucose



**Figure 5.** Production of biomass and consumption of sucrose, glucose, fructose, and ChA by *A. niger* C23308.

and fructose; the uptake rate of glucose was also higher than that of fructose. Sucrose was completely hydrolyzed and the glucose exhausted at 24 h of cultivation; whereas fructose and ChA were consumed after 36 h of cultivation.

The concentration of biomass remained nearly constant between 24 and 36 h of cultivation, showing diauxic behavior. The high substrate to biomass yield ( $0.61 \text{ g g}^{-1}$ ) at 36 h can be explained by the presence of yeast extract ( $3 \text{ g L}^{-1}$ ) in the culture medium. However, growth after 46 h of incubation can be explained by consumption of QA as a carbon source (see Figures 3 and 5). Palumbo et al.<sup>37</sup> demonstrated that biomass yield was 13% higher in cultures containing both (100 mM) and ChA (20 mM), in comparison with cultures containing glucose alone. Frost et al.<sup>36</sup> described the synthesis of QA from glucose. In a reversible reaction, QA can form two possible compounds: 3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (3-DHAP) and 3-dehydroshikimate (3-DHS). 3-DHAP can be transformed to phosphenol-pyruvate and erythrose-4-phosphate, while 3-DHS can be used to produce phenylalanine, tyrosine, and tryptophan. All the final products can be used in the production of biomass. Possibly the yeast extract and QA, as compounds in the culture medium, both contributed to increasing the concentration of biomass.

From this perspective, the utilization of agricultural residues is interesting, particularly the use of CP for enzymatic extraction of ChA using enzymatic extracts produced by SSF with filamentous fungi, and the subsequent biotransformation of ChA to CA and QA by cultures of *A. niger* C23308.

### Conclusions

In CP, 77% of ChA and 94% of CA are covalently linked to the cell walls. A mixture of enzyme extracts produced by SSF by filamentous fungi enabled enzymatic extraction of ChA (36.1%) and CA (33%) in a very practical, inexpensive way. Synergistic effect was observed when either two or three enzyme extracts were used. *A. niger* C23308 biotransformed ChA to CA and QA in an equimolar ratio. The production of PA by transformation of CA is reported for the first time, and it is shown that QA can be used as a carbon source by *A. niger* C23308.

### Acknowledgments

CONACYT fellowship 204412. The authors thank Iray Mata-Anaya of the CENIBiot, Costa Rica, for her technical assistance.

### Notation

CA = caffeic acid  
 ChA = chlorogenic acid  
 CP = coffee pulp  
 CPR = CO<sub>2</sub> production rate  
 DM = dry matter  
 FAE = feruloyl esterase activity  
 FCP = fermented coffee pulp  
 HA = hydroxycinnamic acids  
 IDM = initial dry matter  
 PA = protocatechuic acid  
 QA = quinic acid  
 SSF = solid-state fermentation

### Literature Cited

- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric.* 1999;79: 362–372.
- Ulloa RJB, Verreth JAJ, van Weerb JH, Huisman EA. Effect of different chemical treatments nutritional and antinutritional properties of coffee pulp. *Anim Feed Sci Technol.* 2002;99: 195–204.
- Torres-Mancera MT, Córdova-López J, Rodríguez-Serrano G, Roussos S, Ramírez-Coronel A, Favela-Torres E, Saucedo-Castañeda G. Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technol Biotechnol.* 2011;49:369–373.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI), Mexico. National Institute of Statistics, Geography and Informatics, *Annual Statistics* 2009. Available at: www.inegi.org.mx/.
- Asther M, Estrada-Alvarado M, Haon M, Navarro D, Asther M, Lesage-Meessen L, Record E. Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalyzing the hydrolysis of chlorogenic acid. *J Biotechnol.* 2005;115: 47–56.
- Kikuzaki H, Hisamoto M, Hirose K, Akiyama K, Taniguchi H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem.* 2002;50:2161–2168.
- Arellano-González MA, Ramírez-Coronel A, Torres-Mancera MT, Pérez-Morales GG, Saucedo-Castañeda G. Antioxidant activity of fermented and nonfermented coffee (coffea arabica) pulp extracts. *Food Technol Biotechnol.* 2011;49:374–378.
- Azevedo ABA, Mazzafera P, Mohamed RS, Vieira de Melo SAB, Kieckbusch TG. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *Braz J Chem Eng.* 2008;25:543–552.
- Leresche J, Meyer H. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Org Process Res Dev.* 2006;10:572–580.
- Madhavi-Latha G, Srinivas P, Muralikrishna G. Purification and characterization of ferulic acid esterase from malted finer millet (*Eleusine coracana*, Indaf-15). *J Agric Food Chem.* 2007;55: 9704–9712.
- Benoit I, Navarro D, Marnet N, Rakotomanomana N, Lesage-Messen L, Sigoillot JC, Asther M, Asther M. Feruloyl esterases as a pool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydr Res.* 2006;341:1820–1827.
- Baqueiro-Peña I, Rodríguez-Serrano G, González-Zamora E, Augur C, Loera O, Saucedo-Castañeda G. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Bioresour Technol.* 2010;101:4721–4724.
- Saucedo-Castañeda G, Trejo-Hernández MR, Lonsane BK, Navarro JM, Roussos S, Dufour D, Raimbault M. On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochem.* 1994;29:13–24.
- Chowdhury BR, Chakraborty R, Chaudhuri UR. Validity of modified Gompertz and Logistic models in predicting cell growth of *Pediococcus acidilactici* H during the production of bacteriocin pediocin AcH. *J Food Eng.* 2007;80:1171–1175.

AQ2

AQ3

15. Tovar-Castro L, García-Garibay M, Saucedo-Castañeda G. Lactase production by solid state cultivation of *Kluyveromyces maxianus* CDBBL 278 on an inert support. Effect to inoculum, buffer and nitrogen source. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008;151: 610–617.
16. Barghini P, Di Gioia D, Fava F, Ruzzi M. Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions. *Microb Cell Fact.* 2007;6:1–11.
17. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem.* 1952;193:265–275.
18. Pérez-Morales GG, 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.
19. Oriol E, Conteras R, Raimbault M. Use of microcalorimetry for monitoring the solid state culture of *Aspergillus niger*. *Biotechnol Tech.* 1987;1:79–84.
20. Asther M, Haon M, Roussos S, Record E, Delattre M, Lesage-Meesen L, Labat M, Asther M. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. *Process Biochem.* 2002;38:685–691.
21. Ramírez L, Arrizon J, Sandoval G, Cardador A, Bello-Mendoza R, Lappe P, Mateos-Díaz JC. A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases and chlorogenate esterases. *Appl Biochem Biotechnol.* 2008;151:711–723.
22. Hegde S, Cavita S, Varadaraj MC, Muralikrishna G. Degradation of cereal bran polysaccharides acid by *Aspergillus niger* CFR 1105. *Food Chem.* 2006;96:14–19.
23. Bartolomé B, Faulds C, Kroon P, Waldron K, Gilberto H, Hazlewood G, Williamson G. An *Aspergillus niger* esterase (ferulic acid esterase III) and recombinant *Pseudomonas fluorescens* subsp. Cellulose esterase (XylID) release 5-5'-ferulic dehydrodimer (diferulic acid) from barley and wheat cell wall. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63:208–212.
24. Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;63:647–652.
25. Tillett R, Walker JRL. Metabolism of ferulic acid by a *Penicillium* sp. *Arch Microbiol.* 1990;154:206–208.
26. Smith M, Weaver V, Young D, Ornston N. 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. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:524–532.
27. Estrada-Alvarado I, Lomascolo A, Navarro M, Asther M, Lesage-Meesen L. Evidence of a new biotransformation pathway of *p*-coumaric acid into *p*-hydroxybenzaldehyde in *Pycnoporus cinnabarinus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;57: 725–730.
28. Torres y Torres J, Rosazza J. Microbial transformations of *p*-coumaric acid by *Bacillus magaterium* and *Curvularia lunata*. *J Nat Prod.* 2001;64:1408–1414.
29. Tack EF, Chapman PJ, Dagley S. Metabolism of gallic acid and syringic acid by *Pseudomonas putida*. *J Biol Chem.* 1972;20: 6438–6443.
30. Sparmins VL, Dagley S. Alternative routes of aromatic catabolism in *Pseudomonas acidovorans* and *Pseudomonas putida*: gallic acid as a substrate and inhibitor of dioxygenases. *J Bacteriol.* 1975;124:1374–1381.
31. Crawford RL. Novel pathway for degradation of protocatechuic acid in *Bacillus* species. *J Bacteriol.* 1975;121:531–336.
32. Gurujeyalakshmi G, Mahadevan A. Dissimilation of ferulic acid by *Bacillus subtilis* Curr *Microbiol.* 1987;16:69–73.
33. Adachi O, Ano Y, Akakabe Y, Shinagawa E, Matsushita K. Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of Chlorogenic hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;81:145–151.
34. Benoit I, Asther M, Bourne Y, Navarro, D, Canaan S, Lesage-Meesen L, Herweijer M, Coutinho PM, Asther M, Record E. Gene Overexpression and biochemical characterization of the biotechnologically relevant chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5624–5632.
35. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxynamic acid). *Toxicol.* 2006;217:213–220.
36. Frost JW, Draths M, Ward TL. Synthesis of quinic acid form glucose. U.S. Patent Documents. 1998; Patent Number 5789236. U.S. Cl. 435/136.
37. Palumbo JD, Keeffe TL, Mahoney NE. Inhibition of ochratoxin A production and growth of *Aspergillus* species by phenolic antioxidant compounds. *Mycopathologia.* 2007;164:241–248.

Manuscript received Sep. 27, 2012, and revision received Jan. 4, 2013.

Author Proof

## Enzymatic Extraction of Hydroxycinnamic Acids from Coffee Pulp

María Teresa Torres-Mancera<sup>1</sup>, Jesús Cordova-López<sup>2</sup>, Gabriela Rodríguez-Serrano<sup>1</sup>,  
Sebastianos Roussos<sup>3</sup>, Ma. Ascención Ramírez-Coronel<sup>1</sup>, Ernesto Favela-Torres<sup>1</sup>  
and Gerardo Saucedo-Castañeda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University (UAM-I),  
Av. San Rafael Atlixco 186, Vicentina 09340, D.F. Mexico

<sup>2</sup>University of Guadalajara (CUCEI), Blvd. Marcelino García Barragán 1421,  
Olímpica-44430 Guadalajara, Jalisco State, Mexico

<sup>3</sup>Department of Microbial Ecology and Biotechnology, Paul Cezanne University,  
FST Avenue Escadrille Normandie Niémen, FR-13397 Marseille Cedex 20, France

Received: September 18, 2010

Accepted: January 25, 2011

### Summary

Ferulic, caffeic, *p*-coumaric and chlorogenic acids are classified as hydroxycinnamic acids, presenting anticarcinogenic, anti-inflammatory and antioxidant properties. In this work, enzymatic extraction has been studied in order to extract high value-added products like hydroxycinnamic acids from coffee pulp. A commercial pectinase and enzyme extract produced by *Rhizomucor pusillus* strain 23aIV in solid-state fermentation using olive oil or coffee pulp (CP) as an inducer of the feruloyl esterase activity were evaluated separately and mixed. The total content (covalently linked and free) of ferulic, caffeic, *p*-coumaric and chlorogenic acids was 5276 mg per kg of coffee pulp. Distribution was as follows (in %): chlorogenic acid 58.7, caffeic acid 37.6, ferulic acid 2.1 and *p*-coumaric acid 1.5. Most of the hydroxycinnamic acids were covalently bound to the cell wall (in %): *p*-coumaric acid 97.2, caffeic acid 94.4, chlorogenic acid 76.9 and ferulic acid 73.4. The content of covalently linked hydroxycinnamic acid was used to calculate the enzyme extraction yield. The maximum carbon dioxide rate for the solid-state fermentation using olive oil as an inducer was higher and it was reached in a short cultivation time. Nevertheless, the feruloyl esterase (FAE) activity (units per mg of protein) obtained in the fermentation using CP as an inducer was 31.8 % higher in comparison with that obtained in the fermentation using olive oil as the inducer. To our knowledge, this is the first report indicating the composition of both esterified and free ferulic, caffeic, *p*-coumaric and chlorogenic acids in coffee pulp. The highest yield of extraction of hydroxycinnamic acids was obtained by mixing the produced enzyme extract using coffee pulp as an inducer and a commercial pectinase. Extraction yields were as follows (in %): chlorogenic acid 54.4, ferulic acid 19.8, *p*-coumaric acid 7.2 and caffeic acid 2.3. An important increase in the added value of coffee pulp was mainly due to the extraction of chlorogenic acid.

**Key words:** coffee pulp, olive oil, hydroxycinnamic acids, antioxidants, solid-state fermentation

\*Corresponding author; E-mail: saucedo@xanum.uam.mx, te1982re@gmail.com

**Abbreviations:** FA: ferulic acid, CA: caffeic acid, *p*-CA: *p*-coumaric acid, ChA: chlorogenic acid, CP: coffee pulp, SSF: solid-state fermentation, FAE: feruloyl esterase, HAs: hydroxycinnamic acids

## Introduction

Coffee pulp (CP) represents the most abundant waste obtained after wet pulping of coffee cherries. It is estimated that CP represents 40 % of several million tonnes of coffee cherries processed by the wet method in Mexico, Central America and Colombia. In Mexico, a production of 3760 million tonnes was reported in 2008 (1). This by-product contains 23–27 % fermentable sugars on a dry mass basis. CP treatment should be carried out in order to avoid serious problems of pollution in rivers and soil close to the industrial coffee processing facilities (beneficios). Several alternatives have been suggested for the utilisation of CP for fuel production, furfural extraction and as a fermentable substrate (1). However, it is a material that could be used for the extraction of high-value compounds such as hydroxycinnamic acids (ferulic acid, caffeic acid and *p*-coumaric acid) (2). The hydroxycinnamic acids (HAs) are usually covalently linked to polysaccharides of plant cell walls through ester linkage. They exhibit anticarcinogenic, anti-inflammatory and antioxidant properties. These properties are of great interest for the food, pharmaceutical and cosmetology industries (3). Ferulic acid (FA) is found in a wide variety of plant cell walls and can be used as an additive due to its ability to inhibit peroxidation of fatty acids and constitutes the active ingredient in many skin lotions and sunscreens. Commercial utilisation of natural FA has been limited by its availability and cost (2). In plant material, HAs are also found as a soluble conjugate of quinic acid named chlorogenic acid (4). As a consequence, enzymes allowing the release of these aromatic compounds are of special interest due to their potential industrial applications.

Feruloyl esterases (FAE; E.C. 3.1.1.73), belonging to a subclass of the carboxylic acid esterases (E.C. 3.1.1.1), have been found to cleave the ester linkage between FA and plant cell wall polysaccharides. They are organised into four functional classes named types A, B, C and D according to their ability to hydrolyse the four methyl esters of HAs, methyl ferulate, methyl caffeate, methyl sinapate and methyl *p*-coumarate. Types A and B feruloyl esterases hydrolyse methyl ferulate and methyl *p*-coumarate. Type A feruloyl esterase also hydrolyses methyl sinapate and type B also hydrolyses methyl caffeate. Types C and D feruloyl esterases hydrolyse the four methyl esters of HAs. Only types A and D release diferulic compounds (5). On the other hand, hydrolytic enzyme lipases are glycerol ester hydrolases (E.C. 3.1.1.3), which hydrolyse ester linkages of glycerides at the water-oil interface. There are three amino acid residues in the FAE active site: serine (Ser), aspartic acid (Asp) and histidine (His) (5,6). FAE presents a protein sequence homology belonging to the same family as the serine proteases, esterases and lipases, with a serine residue acting as the nucleophile in a catalytic region comprising the hydroxyl group of the active serine, the imidazole side chain of histidine and a buried carboxylic acid chain, a similar catalytic mechanism to the fungal lipases. Therefore, the lipases can exhibit FAE activity (5,7,8). The use of single enzymatic activities is not recommended for the release of HAs from natural plant polymers, so the use of suitable enzyme mixtures including pectinase, xylanase and amylase has been reported (4,5).

FAE production by microorganisms has become important, especially in biotechnological processes for many industries and medicinal applications (9). Thus the discovery of new FAEs with novel properties continues to be an important research area. FAE is produced from *Aspergillus* sp. using either solid-state fermentation (SSF) or submerged fermentation, along with pectinases, cellulases and xylanases, and can release HAs from wheat bran, rice bran, sugar cane, bamboos and sugar beet pulp, among others. SSF is attractive because it presents many advantages for fungal cultivation. The solid supports used in the SSF process can be inert materials such as perlite or natural materials such as agricultural, forestry and food processing residues and wastes, used as inducers and carbon sources for the production of FAEs. *Penicillium* sp. and the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile* are capable of producing FAEs when grown on agricultural residues such as sugar beet pulp and brewer's spent grain under SSF (9). An esterase from *Fusarium oxysporum* plays a significant role in the production of flavouring and fragrance compounds from geraniol and fatty acids. Pentylferulate ester, a flavour precursor in food processing and also in cosmetics, is a product of FAE using water-in-oil microemulsions (10). Currently, there are no reports of FAE production using SSF by *Rhizomucor pusillus*. The aim of this work is to evaluate the release of the HAs from the cell wall of coffee pulp (CP) by enzymatic treatment of commercial pectinase and enzyme extract produced in SSF by *R. pusillus* using olive oil or CP as inducers.

## Material and Methods

### Strain, conservation and propagation

*Rhizomucor pusillus* strain 23aIV was obtained from the microorganism collection of Dr. Jesús A. Córdova López (University of Guadalajara, Jalisco State, Mexico). The strain was maintained on agar plates at 4 °C. The inoculum was prepared by culturing *R. pusillus* in 500-mL Erlenmeyer flasks containing 60 mL of potato dextrose agar (PDA) at 30 °C for 5 days. Spores were harvested with 30 mL of Tween 80 solution (0.01 %) and recovered with a magnetic stirrer. Spores were counted using a Neubauer hemocytometer (Blaubrand, Germany).

### Agro-industrial substrate

Coffee pulp was obtained from a commercial co-operative enterprise, Beneficios de café (Veracruz, Mexico). For conservation, CP was dried at 60 °C for 24 h until it reached a moisture content close to 5 % and it was ground and sieved (particle sizes 0.8 mm and 1.12 cm). Distilled water was added to CP to reach a moisture content of 30 %, and then it was autoclaved for 10 min at 103.42 kPa.

### Solid-state fermentation conditions

*R. pusillus* 23aIV was cultivated in SSF under two conditions: (i) perlite was used as an inert support impregnated with a culture broth reported by Rodríguez *et al.* (11), and olive oil as the inducer, and (ii) CP as the substrate, which was impregnated with the medium reported by Asther *et al.* (12) and diluted to 50 %. Glass columns (20×2.5 cm of diameter) were packed with per-

lite (particle sizes 0.8 and 1.19 mm) or CP (1.12 cm) impregnated with the inoculated culture medium. The medium was inoculated with  $3 \cdot 10^7$  spores per g of dry substrate and the moisture content was adjusted to 60 %. Columns were incubated at 40 °C. Fungal growth was determined by monitoring the production of CO<sub>2</sub> (13). Results were expressed as mg of CO<sub>2</sub> per g of dry matter (DM) per hour.

#### Collection of the enzyme extract

At the end of culture fermentation, the solids were dried by passing through an air flow of 10 L/min at 30 °C for less than 20 min, until a moisture content close to 5 % was reached. FAE crude enzyme extracts were obtained in a 1:5 (by mass per volume) mixture of fermented solids (dry basis) and 50 mM citrate buffer at pH=6. The mixture was stirred using a vortex mixer for 5 min and was centrifuged at 5 000 rpm for 15 min in a centrifuge (Allegra<sup>TH</sup> 25R; Beckman Coulter Inc., Mexico City, Mexico), at 4 °C. The crude enzyme extracts were stored at 4 °C until use.

#### Enzymatic extraction

Enzymatic extraction of HAs from CP without free HAs was performed as follows: dry CP (10 g) was mixed with 90 mL of citrate buffer (50 mM, pH=6). Five enzymatic treatments were performed as indicated in Table 1.

Table 1. Enzymatic treatments

Enzyme extracts	Inducer	Treatments				
		A	B	C	D	E
Commercial pectinase*		X			X	X
FAE by <i>R. pusillus</i> **	olive oil		X		X	
	coffee pulp			X		X

\*10 U of commercial pectinase from *A. niger* (Fluka, USA)

\*\*10 U of FAE activity produced in this work by SSF

The enzymatic extraction was performed in darkness at 30 and 40 °C under continuous stirring (100 rpm). Samples were taken at 0, 1, 3, 6 and 12 h of the reaction. A selective extraction of HAs was carried out with a ratio of sample to ethyl acetate of 1:1 (by volume). Then, HA levels were determined by HPLC.

#### Determination of HAs in CP

Total content of FA, CA, *p*-CA and ChA was determined by alkaline hydrolysis as follows: a CP sample of 10 g (particle size 0.8 mm) was mixed with 50 mL of 2 M NaOH (pH=12), and hydrolysis was carried out at 50 °C and 100 rpm for 2 h. Then, the supernatant was acidified to pH=3 with HCl (J.T. Baker, Mexico City, Mexico) and the extraction of HAs with ethyl acetate (J.T. Baker) was carried out as indicated above, followed by HPLC analysis. Free (non-covalently linked) FA, CA, *p*-CA and ChA were extracted with aqueous methanol (80 %) as follows: a sample of CP of 10 g (particle size 0.8 cm) was mixed with 50 mL of aqueous methanol (80 %) at 40 °C and 100 rpm for 30 min. The supernatant was evaporated (50 °C) under reduced pressure in a rotavapor

(R-200; Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) and then analysed by HPLC (14). Exhausted solids of CP without free HAs were dried to moisture content close to 5 % and stored until use.

#### Enzyme assay

FAE activity was measured using a titrimetric technique. The reaction was performed in a mixture of 4.5 mM methyl ferulate (Extrasynthese, Genay Cedex, France) and the enzyme extract in a ratio of 12:1 (by volume) at 45 °C, pH=6, for 15 min. The volume of NaOH added to maintain the pH constant (6.0) was registered continuously for 15 min using a DL 21 titrator (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland). Activities were expressed in enzyme units (U). One U was defined as the amount of enzyme required to release 1 µmol of product per minute under the assay conditions. Protein concentration was determined according to Lowry *et al.* (15).

#### HPLC analysis

HPLC was performed using an LC 250 binary LC pump (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA), coupled with a variable UV/VIS detector and a Varian Polaris 5 amide C-18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) reversed phase column (200×4.6 mm) at 36 °C and with a mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was a mixture of two solvents: solvent A was an aqueous solution of acetic acid (0.5 %), and solvent B was methanol. Separation was achieved by an elution gradient using an initial composition of 0 to 12 min of 80 % solvent A. Solvent A was then decreased to 10 % in 5 min and it was increased to 80 % in 10 min. Then, the column was washed with 80 % solvent A for 5 min (4).

## Results and Discussion

#### Content of HAs in CP

The content of esterified and free FA, CA, *p*-CA and ChA in CP was 4416.7 and 856 mg of HAs per kg of CP, respectively. Most HAs in the CP were covalently bound to the cell wall and were probably esterified. The distribution of linked *p*-CA, CA, ChA and FA was 97.2, 94.4, 76.9 and 73.4 %, respectively (Table 2). The total mass of these HAs per mass (kg) of CP was in agreement with that reported by other authors: 3600–27000 mg of ChA, 1600–3100 mg of CA, 100–240 mg of FA and 80 mg of *p*-CA (4,16,17). CP was rich in ChA and CA. The ChA covalently bound to the cell wall was probably responsible for the resistance of cell wall to the degradation by the microorganism (18). The conditions used during the alkaline hydrolysis allowed for the determination the content of ChA, without hydrolysis into CA and quinic acid. This paper reports for the first time the esterified and free amounts of FA, CA, *p*-CA and ChA in coffee pulp.

#### Enzyme production in SSF

Fig. 1 shows the CO<sub>2</sub> production rate (CPR) by *R. pusillus* under the two conditions used. The maximum value of CPR using CP as the substrate of (5.9±0.05) mg of CO<sub>2</sub> per h per g of DM was reached after 31 h of cultivation. This value was increased by a factor of 2.3 after

Table 2. Hydroxycinnamic acid composition of coffee pulp on a dry basis

	$w(\text{chlorogenic acid})$ mg/kg	$w(\text{caffeic acid})$ mg/kg	$w(\text{ferulic acid})$ mg/kg	$w(p\text{-coumaric acid})$ mg/kg
Esterified+free HAs*	3097±3.5	1985±3.6	113±4.7	81±6.0
Esterified HAs**	2382.8±4.5	1873.1±4.5	83±5.8	78.7±5.9
Free HAs***	714.2±4.7	111.9±4.9	30±7.0	traces

Data are mean values of triplicate analyses; \*alkaline hydrolysis: 2 M NaOH, 2 h, 50 °C, 100 rpm; \*\*calculated as the difference between total HAs and free HAs; \*\*\*extraction with 80 % methanol, 30 min, 40 °C, 100 rpm; traces: not detected by HPLC

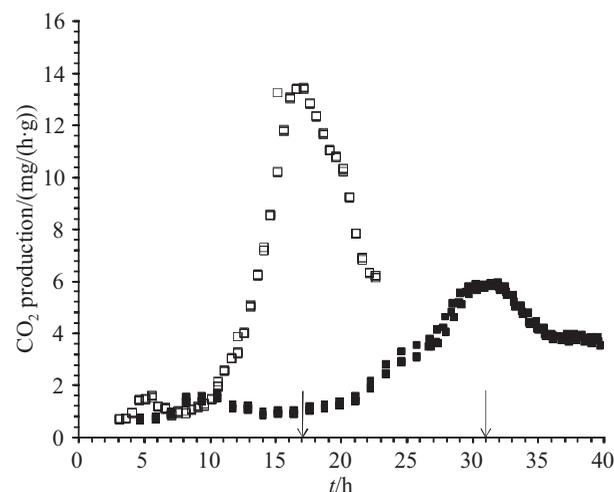


Fig. 1. Production of CO<sub>2</sub> by *R. pusillus* in SSF expressed as mass (mg) of CO<sub>2</sub> per time (h) per mass (g) of dry matter (DM) using agrolite as an inert support and olive oil as an inducer (□) and CP as both support and inducer (■). Arrows indicate the fermentation time for the collection of the enzyme extract

17 h of cultivation when olive oil was used as an inducer. These differences were probably due to the type of inducer and culture medium composition used in the SSF (12).

The enzyme extract was obtained when the maximum CPR in the SSF was reached. In previous studies (data not shown), we had demonstrated that the maximum FAE activity is well correlated with the maximum CPR. After this event, the FAE activity decreased, probably due to the presence of proteases. The FAE activity found in the extract from commercial pectinase was 5.3 and 4.3 times greater than that found in the enzymatic extract produced by *R. pusillus* using olive oil or coffee pulp as inducers, respectively (Table 3). The FAE activities of both enzymatic extracts per DM were higher than previously reported (12) for FAE by *Aspergillus niger* (0.03 U/g). There are no reports of FAE production using SSF by *Rhizomucor pusillus*.

### Enzymatic extraction of HAs

The enzymatic extraction of HAs was performed with a mixture of enzymatic extracts as shown Table 1. The best conditions (data shown) for enzymatic extraction of FA, CA, *p*-CA and ChA were determined to be 40 °C for 6 h at 100 rpm.

Table 3. FAE activity in enzymatic extract

Support/ inducer	Enzymatic extract	FAE activity	
		U/mg	U/g
	Commercial pectinase	31.28±0.05*	52.13±0.03**
Agrolite/ olive oil	Esterase (23aIV)	0.85±0.13*	9.89±0.03***
CP/CP	Esterase (23aIV)	1.12±0.10*	12.11±0.05***

Data are mean values of triplicate analyses; \*U per mass (mg) of protein, \*\*U per mass (g) of dry solid, \*\*\*U per mass (g) of fermented dry substrate; pectinase was from *Aspergillus niger* (1.41 U/mg)

The two enzymatic extracts produced by *R. pusillus* released HAs from CP and showed different enzyme activities. CP was a better inducer than olive oil for specific FAE production. The amount of free ChA, CA, FA and *p*-CA released by the esterases increased in the presence of pectinase (Table 4).

The commercial pectinase extract exhibited both de-esterifying and depolymerising activities. These enzyme activities were responsible for the increase in the extraction yield of HAs from CP. These results suggest that the pectinase activity solubilised part of the cell wall structure of CP. Table 4 shows the results of HA extraction using five different treatments. It is worth noting that the extraction yields of the combined treatments (D and E) were higher in comparison with those obtained using individual enzyme extracts (A, B, C).

Asther *et al.* (12) reported an extraction yield of 68 % for FA in the treatment of CP with FAE type A by *A. niger* with xylanase. This value was higher than the extraction yield obtained in this study. However, there are no data that mention the origin of the extracted FA, either covalently bound to the cell wall or free. Furthermore, no data were provided about the extraction of other HAs such as ChA, CA and *p*-CA.

The enzymatic extract produced by SSF using CP as an inducer had the ability to release *p*-CA from the cell wall of CP. These results strongly suggest that the production of different types of FAE depends on the kind of inducer used in the SSF. Further studies on purification and characterisation of different FAE types could help to establish a detailed relationship with the inducer used. The HA that was released from CP in the highest amount was ChA. The commercial value of the HAs produced in this work was calculated, with the added value of CP close to 4846 US\$/tonne. The main compound extracted

Table 4. Hydroxycinnamic acids extracted using different treatments of coffee pulp without free HAs

Treatments	Hydroxycinnamic acids				
	Chlorogenic acid	Caffeic acid	Ferulic acid	<i>p</i> -Coumaric acid	
A	<i>w</i> (HA)/(mg/kg)	940.30±4.8	34.33±4.9	15.12±6.3	traces
	Y/%	39.5	1.8	18.2	
B	<i>w</i> (HA)/(mg/kg)	105.72±4.7	9.65±4.9	3.21±2.7	traces
	Y/%	4.4	0.5	3.9	
C	<i>w</i> (HA)/(mg/kg)	331.03±5.7	19.17±2.4	3.17±2.4	5.15±1.3
	Y/%	13.9	1.0	3.8	6.5
D	<i>w</i> (HA)/(mg/kg)	1072.8±4.9	49.8±4.9	21.2±6.4	traces
	Y/%	45.0	2.7	25.5	
E	<i>w</i> (HA)/(mg/kg)	1296.24±3.3	43.99±3.2	16.43±3.6	5.67±1.2
	Y/%	54.4	7.2	19.8	2.3

Data are mean values of triplicate analyses; values were expressed on dry basis; extraction yield (Y) corresponded to the HAs covalently bonded to the cell wall of CP; traces: not detected by HPLC

was CA, and its highest commercial value represents 94.3 % of the total value-added CP.

## Conclusion

To our knowledge, this is the first report on the esterified and free FA, CA, *p*-CA and ChA content in CP. The SSF with *R. pusillus* using olive oil as an inducer showed an earlier CO<sub>2</sub> production rate, compared to CP used as the substrate. Only the enzymatic extract produced by SSF using CP as the inducer had the ability to release *p*-CA from the cell wall of CP. The commercial pectinase extract exhibited both de-esterifying and depolymerising activities, which could be responsible for the increase in the extraction yield of HAs studied in this work. This study shows the potential of the enzymatic release of antioxidants such as FA, CA, *p*-CA and ChA from CP using commercial esterases produced by SSF.

## References

- G. Urbaneja, R.J. Ferrer, G. Páez, L. Arenas de Moreno, G. Colina, L. Sandoval, Acid hydrolysis and characterization of carbohydrates from coffee pulp, *Rev. Fac. Agron.* 14 (1996) 265–275 (in Spanish).
- C.B. Faulds, B. Bartolomé, G. Williamson, Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases, *Ind. Crop. Prod.* 6 (1997) 367–374.
- C.B. Faulds, G. Williamson, The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall, *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 393–395.
- I. Benoit, D. Navarro, N. Marnet, N. Rakotomanomana, L. Lesage-Meessen, J.C. Sigoillot *et al.*, Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products, *Carbohydr. Res.* 341 (2006) 1820–1827.
- V.F. Crepin, C.B. Faulds, I.F. Connerton, Functional classification of the microbial feruloyl esterases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63 (2004) 647–652.
- M.A. Kashmiri, A. Adnan, B.W. Butt, Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*, *Afr. J. Biotechnol.* 5 (2006) 878–882.
- C.B. Faulds, R. Molina, R. González, F. Husband, N. Juge, J. Sanz-Aparicio, J. Hermoso, Probing the determinants of substrate specificity of a feruloyl esterase, AnFaeA, from *Aspergillus niger*, *FEBS J.* 272 (2005) 4362–4371.
- K.E. McAuley, A. Svendsen, S.A. Patkar, S. Wilson, Structure of a feruloyl esterase from *Aspergillus niger*, *Acta Cryst. D*, 60 (2004) 878–887.
- A.E. Fazary, Y.H. Ju, Feruloyl esterases as biotechnological tools: Current and future perspectives, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39 (2007) 811–828.
- T. Panda, B.S. Gowrishankar, Production and applications of esterases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67 (2005) 160–169.
- J.A. Rodríguez, J.C. Mateos, J. Nungaray, V. González, T. Bhagnagar, S. Roussos *et al.*, Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultures in solid state fermentation, *Process Biochem.* 41 (2006) 2264–2269.
- M. Asther, M. Haon, S. Roussos, E. Record, M. Delattre, L. Lesage-Meessen *et al.*, Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: A comparison of the production in solid state and submerged fermentation, *Process Biochem.* 38 (2002) 685–691.
- G. Saucedo-Castañeda, M.R. Trejo-Hernández, B.K. Lonsane, J.M. Navarro, S. Roussos, D. Dufour, M. Raimbault, On-line automated monitoring and control systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in aerobic and anaerobic solid-state fermentations, *Process Biochem.* 29 (1994) 13–24.
- A. Ramírez-Coronel, N. Marnet, V.S. Kumar Kolli, S. Roussos, S. Guyot, C. Augur, Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 1344–1349.
- O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- M. Labat, C. Augur, B. Rio, I. Perraud-Gaime, S. Sayadi, Biotechnological potentialities of coffee and similar with olive, two models of agroindustrial products rich in polyphenolic compounds, *Proceedings of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-Industry, Coffee Biotechnology and Quality*, Dordrecht, The Netherlands (2000) pp. 517–531.
- S. Roussos, M. de los Angeles Aquíhuatl, M. del Refugio Trejo-Hernández, I. Gaime Perraud, E. Favela, M. Ramakrishna *et al.*, Biotechnological management of coffee pulp – Isolation, screening characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42 (1995) 756–762.
- P.A. Kroon, G. Williamson, Hydroxycinnamates in plants and food: Current and future perspectives, *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 355–361.