

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD



“Producción de cafeoil, feruoil y *p*-cumaroil esterases por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono”

**Tesis que para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA**

Presenta:
PATRICIA RUIZ SANCHEZ
Ingeniera en Alimentos

Julio de 2002

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-0/Maestría en Biotecnología**.

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

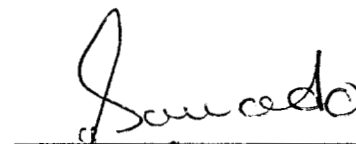
“Producción de cafeoil, feruoil y *p*-cumaroil esterases por *Aspergillus awamori*
NRRL 3112 a partir de diferentes fuentes de carbono”

que presentó
Patricia Ruiz Sánchez

El día 19 de julio del año 2002

Comité tutorial:

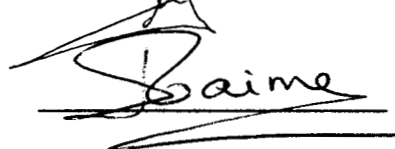
Director: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



Asesor Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

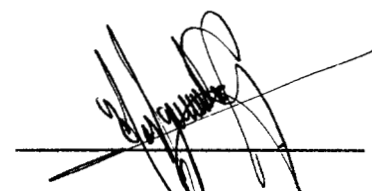


Asesor Dra. Isabelle Gaimé Perraud
Institut de Recherche pour le Développement

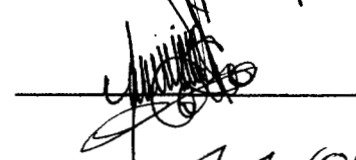


Comité de evaluación:

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



Secretario: Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa



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



Vocal Dra. Isabelle Gaimé Perraud
Institut de Recherche pour le Développement



DEDICATORIA

A Dios
A mi hermano Juan Oscar
A mis padres Francisca y Juan
A mis hermanos Miguel y César
A Gaby y Lili

AGRADECIMIENTOS

A los Drs. Gerardo Saucedo, Isabelle Gaimé y Ernesto Favela les expreso mi más sincera gratitud por haber dirigido mi tesis, así como por la paciencia, las enseñanzas, el apoyo, la amistad y las críticas constructivas que siempre tuve de ustedes, gracias.

A los Drs. Cristóbal Aguilar, Francisco Cruz y Octavio Loera les agradezco el haber aceptado formar parte del comité de evaluación, así como por sus valiosos comentarios y correcciones.

A los Drs. Marc Labat, Michèle Asther y Sévastianos Roussos del Institut Fédératif de Recherche de Marsella, Francia, les agradezco el haberme recibido y colaborado en esta investigación durante 6 meses de estancia en sus laboratorios.

Al Dr. Craig Faulds del Institute of Food Research de Norwich, Inglaterra, mi más sincera gratitud por el apoyo científico brindado a este trabajo, así como por su amistad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para la realización de la maestría y al Departamento de Formación del Institut de Recherche pour le Développement por haberme otorgado el financiamiento para la realización de la estancia en el Institut Fédératif de Marsella, Francia.

A todos mis compañeros de generación por el apoyo y los momentos de alegría que pasamos juntos.

A todos los compañeros de la Planta piloto 4 y del Institut Fédératif en especial a la Sra. María Elena, Cristóbal Aguilar, Christian Assih, Michel Delattre, Isabel Estrada, Paty Estrada, Tere Flores, Malick Mbengue, Elizabeth Miranda, Isaías Nava, Lupita Olmedo, Juan Romano, Lulu Romero y Anita Gómez.

A Paty Castilla, Verónica Espinosa, Arturo Figueroa, Bernard Rio, Oscar Soto, Gloria Trejo y Antonio Velasco gracias por todo su apoyo.

RESUMEN

En esta investigación se estudió la producción de cafeoil, feruoil y *p*-cumaroil esterases a partir de diferentes fuentes de carbono. Para la cuantificación de las actividades cafeoil esterasa I, cafeoil esterasa II, feruoil esterasa y *p*-cumaroil esterasa se desarrolló una técnica por espectrofotometría UV, basada en la medición simultánea de sustrato y de producto en un sistema de reacción.

A fin de seleccionar una cepa capaz de producir la cafeoil esterasa I, *Aspergillus niger* Aa20, *Aspergillus awamori* NRRL 3112 y *Penicillium commune* V33A25 fueron cultivados en medio líquido, utilizando al xilano de avena (1.5% p/v) como fuente de carbono, únicamente *Aspergillus awamori* NRRL 3112 fue capaz de utilizar al xilano de avena como inductor de la producción de cafeoil esterasa I.

Se evaluó el efecto de diferentes fuentes de carbono tipo cereal (xilano de avena, xilano de avena-ácido ferúlico, trigo sin salvado y salvado de trigo) y tipo pulpa (pulpa de remolacha azucarera, pulpa de café fresca y pulpa de café ensilada) sobre la producción de feruoil, cafeoil y *p*-cumaroil esterases por *Aspergillus awamori*. La concentración utilizada en todos los casos fue de 1.5% p/v, excepto con la pulpa de café ensilada, la cual también fue probada a una concentración de 0.5% p/v.

Los resultados muestran que *Aspergillus awamori* NRRL 3112 produce principalmente la cafeoil esterasa I, al crecer en presencia de todas las fuentes de carbono probadas, excepto con el xilano de avena y la combinación xilano de avena-ácido ferúlico con las que produce tanto la cafeoil esterasa I como la feruoil esterasa. Las principales fuentes de inductores para la producción de la cafeoil esterasa I, fueron la pulpa de café ensilada y el trigo sin salvado ambas a 1.5% p/v, siendo mayor la productividad con la pulpa de café. En cuanto a la pulpa de café ensilada, la producción de cafeoil esterasa I parece ser función de la concentración de pulpa en el medio. La pulpa de café ensilada muestra un incremento en la producción de la cafeoil esterasa I, 4 veces superior al de la pulpa de café fresca. En el caso de la producción de feruoil esterasa la mejor fuente de inductores fue la combinación xilano de avena (1.5% p/v) y ácido ferúlico (0.03% p/v). Esta combinación permitió aumentar la producción de feruoil

esterasa y cafeoil esterasa I en un 112 y 175% respectivamente, con relación a la producción de dichas enzimas al utilizar el xilano de avena en el medio. En la producción de la cafeoil esterasa II, las únicas fuentes de inductores fueron la pulpa de remolacha seguida del salvado de trigo, el resto de las fuentes de carbono probadas no mostró su producción. En cuanto a la producción de *p*-curamoil esterasa, solamente la pulpa de remolacha, el salvado de trigo y la pulpa de café ensilada permitieron su producción.

ABSTRACT

The production of caffeoyl, feruloyl and *p*-coumaroyl esterases from different carbon sources was studied. An spectrophotometric technique which simultaneously monitors substrate and product in a reaction system was developed for analysing the caffeoyl esterase I, caffeoyl esterase II, feruloyl esterase and *p*-coumaroyl activities.

In order to select a producer strain of caffeoyl esterase *Aspergillus niger* Aa20, *Aspergillus awamori* NRRL 3112 and *Penicillium commune* V33A25 were grown in liquid cultures with oat spelt xylan (1.5% w/v) as carbon source and as enzyme inducer. Only *Aspergillus awamori* NRRL 3112 was able to produce the enzyme.

Different carbon sources type cereal (oat spelt xylan, oat spelt xylan-ferulic acid, wheat bran and unbran wheat) and type pulp (sugar beet pulp, fresh and silaged coffee pulp) were assayed for the production of caffeoyl, feruloyl and *p*-coumaroyl esterases by *Aspergillus awamori* NRRL 3112. All substrates were evaluated at 1.5% w/v, except for the silaged coffee pulp which was also tested at 0.5% w/v.

It has been found that *Aspergillus awamori* NRRL 3112 mainly produced caffeoyl esterase I with all of the carbon sources tested, except for the oat spelt xylan and the combination of oat spelt xylan-ferulic acid. With these last substrates as much caffeoyl esterase I as feruloyl esterase were produced. The silaged coffee pulp and the unbran wheat, both at 1.5%w/v, were the main inducers of caffeoil esterase I. A greater productivity was obtained with the coffee pulp. The production of caffeoyl esterase I seemed to be a function of substrate concentration for the silaged coffee pulp. It has been found that anzyme production was four fold for silaged coffee pulp compared to fresh coffee pulp. The best inducer for feruloyl esterase was the combination of oat spelt xylan (1.5% w/v) and ferulic acid (0.03% w/v). This combination increased the feruloyl esterase and caffeoyl esterase production by 112 and 175 %, respectively, compared to the production of these enzymes using oat spelt xylan as substrate. Caffeoyl esterase II was only induced by sugar beet pulp and by wheat bran. *p*-Coumaroyl esterase was produced in the presence of sugar beet pulp, wheat bran and silaged coffee pulp.

Nomenclatura

AF	Ácido ferúlico
Ara ₂ F	[2-O-(trans-feruoil)- α -L-arabinofuranosil]-(1-5)-L-arabinofuranosa
CAE	Cafeoil ácido esterasa
CGA	Ácido clorogénico
CinnAE	Cinamoil ácido esterasa
CML	Cultivo en medio líquido
CMS	Cultivo en medio sólido
F AE	Feruoil ácido esterasa
FAXX	O-{5-O-[(E)-feruoil]- α -L-arabinofuranosil}-(1-3)-O- β -D-xilopiranosil-(1-4)-D-xilopiranososa
MCA	Metil cafeato
MFA	Metil ferulato
MSA	Metil sinapato
MOPS	Ácido 3-morfolino-propano sulfónico
M _p CA	Metil <i>p</i> -cumarato
OSX	Xilano de grano de avena variedad espelta (Oat Spelt Xylan)
OSX + AF	Xilano de avena más ácido ferúlico
PAXX	O-{5-O-[(E)- <i>p</i> -cumaroil]- α -L-arabinofuranosil}-(1-3)-O- β -D-xilopiranosil-(1-4)-D-xilopiranososa
<i>p</i> -CAE	<i>p</i> -Cumaroil ácido esterasa
PCEL	Pulpa de café ensilada y liofilizada
PCFL	Pulpa de café fresca y liofilizada
PDA	Papa dextrosa agar
PRA	Pulpa de remolacha azucarera
rpm	Revoluciones por minuto
SAE	Sinapil ácido esterasa
ST	Salvado de trigo
T	Trigo
U	Cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de producto/min
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DEL CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Compuestos fenólicos	5
2.1.1. Ácidos fenólicos simples y sus derivados	5
2.1.1.1. Ácidos hidroxibenzoicos (C ₆ -C ₁)	6
2.1.1.2. Ácidos hidroxicinámicos (C ₆ -C ₃)	7
2.1.1.3. Los ácidos clorogénicos (ACG)	9
2.1.2. Flavonoides y sus derivados	10
2.1.3. Fenoles poliméricos	11
2.2. La pared celular vegetal	13
2.2.1. Polisacáridos estructurales	13
2.2.2. Los ácidos hidroxicinámicos en la pared celular	14
2.3. Cinamoil ácido esterasas	16
2.3.1. Clasificación y características	16
2.3.2. Microorganismos que producen las cinamoil esterasas	17
2.3.3. Fuentes de inductores de las cinamoil esterasas y condiciones de cultivo	18
2.3.4. Sustratos de las cinamoil esterasas	19
2.3.4.1. Afinidad por el ácido hidroxicinámico	19
2.3.4.2. Especificidad por el enlace con la molécula de azúcar	20
2.3.5. Interacción de las cinamoil esterasas con otras enzimas	25
2.3.5.1. Degradación de la hemicelulosa de la pared celular	25
2.3.5.2. Degradación de la pectina de la pared celular	25
2.3.6. Aplicaciones de las cinamoil esterasas y los ácidos hidroxicinámicos	26
2.4. Productos y subproductos agrícolas	29
2.4.1. El trigo	29
2.4.2. La remolacha azucarera	30
2.4.3. El café	32

3. JUSTIFICACIÓN	35
4. OBJETIVOS	39
4.1. Objetivo general	40
4.2. Objetivos particulares	40
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. Fuentes de inductores probadas	42
5.2. Microorganismos	43
5.3. Conservación de las cepas	43
5.4. Propagación de la cepas	44
5.5. Preparación del cultivo	44
5.5.1. Suspensión de esporas	44
5.5.2. Composición del medio de cultivo	45
5.5.3. Preparación del medio e inoculación	46
5.6. Obtención del sobrenadante	47
5.7. Técnicas analíticas	47
5.7.1. Conteo de esporas	47
5.7.2. Medición de las actividades cinamoil estererasas por espectrofotometría en el UV	47
5.8. Estrategia experimental	48
5.8.1. Selección de la cepa	48
5.8.2. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de cafeoil, feruoil y <i>p</i> -cumaroil estererasas por la cepa seleccionada, <i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112	48
5.9. Expresión de resultados	49
5.10. Análisis estadístico	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
6.1. Establecimiento de una técnica de cuantificación de actividad enzimática con la medición simultánea de sustrato y producto por espectrofotometría en el UV	52
6.1.1. Principio y procedimiento matemático	52

6.1.2. Establecimiento de la técnica	54
6.1.3. Sistema de reacción	58
6.2. Selección de la cepa	59
6.3. Producción de cafeoil I, cafeoil II, feruoil y <i>p</i> -cumaroil esterasas en función de la fuente de carbono	61
6.3.1. Fuentes de carbono de tipo cereal	62
6.3.1.1. Xilano de avena	62
6.3.1.2. Xilano de avena con adición de ácido ferúlico	64
6.3.1.3. Trigo sin salvado	66
6.3.1.4. Salvado de trigo	68
6.3.2. Fuentes de carbono tipo pulpa	71
6.3.2.1. Pulpa de remolacha azucarera	71
6.3.2.2. Pulpa de café fresca	73
6.3.2.3. Pulpa de café ensilada	75
6.3.3. Síntesis de resultados y análisis estadístico	80
7. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	86
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las cinamoil ácido esterasas son enzimas del tipo carboxil éster hidrolasas. Estas enzimas hidrolizan los enlaces éster formados entre los ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, caféico, sinápico y *p*-cumárico) y los azúcares primarios (α -L-arabinosa y/ó β -D-galactosa) de la red de polisacáridos de la pared celular vegetal (Borneman *et al.*, 1990a; Faulds y Williamson, 1999). Las cinamoil esterasas son un grupo de enzimas entre las que se encuentran las feruoil, cafeoil, *p*-cumaroil y sinapil ácido esterasas, las cuales deben su nombre a la afinidad que presenten por un determinado ácido hidroxicinámico.

El interés en el estudio de estas enzimas, radica en la capacidad que presentan para la liberación de los ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico y sinápico, la cual puede ser aprovechada para la liberación de dichos ácidos a partir de la pared celular de diferentes subproductos agrícolas (Kroon y Williamson, 1999). Así mismo, el interés en la obtención de estos ácidos se debe a sus propiedades antioxidantes y anticarcinogénicas. Tales características hacen que estos compuestos sean de gran interés para la industria alimentaria, de cosmetología y farmacéutica (Auerbach y Gray, 1999; Saija *et al.*, 1999; Saulnier *et al.*, 2000). Igualmente, el ácido ferúlico tiene una segunda aplicación en la industria alimentaria, ya que es precursor de un importante saborizante, la vainillina o aldehído vainílico (Thibault *et al.*, 1998).

Las cinamoil esterasas son inducidas por componentes de la pared celular vegetal, tales como hemicelulosa, pectina, lignina y celulosa, presentes en los sustratos utilizados para el crecimiento de cepas fúngicas y bacterianas (Faulds y Williamson, 1999). Principalmente dos enzimas de este tipo, las feruoil y *p*-cumaroil esterasas han sido inducidas al utilizar el xilano de avena, la celulosa, el salvado de trigo, la paja de avena o la pulpa de remolacha azucarera como fuentes de carbono para el crecimiento de cepas tales como *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1999), *Streptomyces avermitilis* (Ferreira *et al.*, 1999), *Aspergillus awamori* (McCrae *et al.*, 1994), *Neocallimastix* MC-2 (Borneman *et al.*, 1991; Borneman *et al.*, 1992) y *Penicillium pinophilum* (Castanares *et al.*, 1992). De esta manera dentro de las cinamoil esterasas mejor estudiadas se encuentran las feruoil y *p*-cumaroil esterasas.

Esta investigación esta dirigida a evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono (xilano de avena, salvado de trigo, trigo sin salvado, pulpa de remolacha azucarera y pulpa de café) sobre la producción de cafeoil esterasa I (CAE-I) y cafeoil esterasa II, (CAE-II), las cuales han sido poco estudiadas en investigaciones previas. Igualmente, es evaluada la producción de las enzimas feruoil esterasa (FAE) y *p*-cumaroil esterasa (*p*-CAE), mismas que han sido poco estudiadas en *Aspergillus awamori*.

La *revisión bibliográfica* inicia con la clasificación de los compuestos fenólicos, localizando así a los ácidos hidroxicinámicos y clorogénicos y su efecto en la producción enzimática. Enseguida se presenta una descripción de los polisacáridos que constituyen la pared celular y su importancia en la producción de las cinamoil esterases. A continuación se presentan los diferentes enlaces éster que existen entre los ácidos hidroxicinámicos y los azúcares primarios de la red de polisacáridos. Posteriormente, se presenta la clasificación y las características de las cinamoil ácido esterases, así como los microorganismos que las producen, la especificidad de sustrato que presentan y sus aplicaciones. Finalmente se presenta una descripción de las diferentes fuentes de carbono inductoras empleadas en esta investigación para la producción de CAE-I, CAE-II, FAE y *p*-CAE.

Los *resultados* obtenidos en esta investigación comprenden 3 partes. En la primera, se presenta el establecimiento de una técnica de cuantificación de las actividades CAE-I, CAE-II, FAE y *p*-CAE esterases mediante la medición simultánea de consumo sustrato y formación de producto; la segunda etapa presenta la selección de la cepa, la cual fue realizada en función de la capacidad de utilizar al xilano de avena como inductor de la cafeoil esterasa I, utilizando al ácido clorogénico para la medición de la actividad. La tercera parte presenta el efecto de diferentes fuentes de carbono (xilano de avena, salvado de trigo, trigo sin salvado, pulpa de remolacha y pulpa de café) sobre la producción de CAE-I, CAE-II, FAE y *p*-CAE por la cepa seleccionada, *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Así mismo se presenta un análisis estadístico de comparaciones múltiples de Tukey entre las diferentes fuentes de carbono probadas en la producción de cada una de las enzimas estudiadas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Compuestos fenólicos

El término “fenólico” es empleado para definir aquellos compuestos que poseen uno o más grupos hidroxilo (OH) como sustitutos en un anillo aromático (Waterman, 1994). El nombre deriva a partir del compuesto aromático simple denominado “fenol”.

Los compuestos fenólicos se encuentran presentes en el reino vegetal. Son considerados como metabolitos secundarios. Se encuentran en las frutas y vegetales, incluyendo manzanas, café, uvas, ciruelas y en las hojas de té entre otras. Los compuestos fenólicos están involucrados en el sistema de protección de las plantas contra la invasión patógena por parte de insectos, bacterias, hongos y virus (Friedman y Jürgens, 2000).

La mayoría de los compuestos fenólicos en las plantas pueden clasificarse en tres grandes grupos:

1. Ácidos fenólicos simples y sus derivados
2. Flavonoides y sus derivados
3. Fenoles poliméricos

A continuación se presentan las estructuras, las fuentes de obtención y las aplicaciones principales de los compuestos fenólicos.

2.1.1. Ácidos fenólicos simples y sus derivados

Los ácidos fenólicos simples poseen un sólo anillo aromático y pueden subdividirse en subgrupos dependiendo del número de carbonos (C_n) que contenga la cadena lateral unida al anillo aromático (C_6). De esta manera la representación de estos compuestos es C_6C_n . Generalmente, el número n se encuentra entre 0 y 3. Entre los principales grupos se encuentran los derivados hidroxilados de los ácidos benzoicos (C_6-C_1) y cinámicos (C_6-C_3).

Otro grupo de gran interés, es el de los ácidos clorogénicos (ACG), los cuales se obtienen a partir de la conjugación entre el ácido quínico y uno o más ácidos hidroxicinámicos.

2.1.1.1. Ácidos hidroxibenzoicos (C_6-C_1)

Los ácidos hidroxibenzoicos poseen un grupo carboxilo unido al anillo bencénico. El compuesto más importante en esta clasificación es el ácido gálico, el cual es el componente mayoritario de los taninos hidrolizables (Waterman, 1994). Otros compuestos importantes son los ácidos salicílico, protocatéquico, vainílico, sirínico y gentísico, así como el salicilaldehído. Algunas de estas moléculas se encuentran representadas en la Figura 2.1.



Figura 2.1. Ejemplos de diferentes tipos de ácidos hidroxibenzoicos.

Los ácidos hidroxibenzoicos se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal. Los ácidos protocatéquico, vainílico, gálico y sirínico pueden estar presentes en forma de conjugados solubles en la pared celular vegetal, unidos por ejemplo a la lignina (Strack, 1997). El ácido salicílico está ampliamente distribuido en la familia de las *Ericáceas* (Rododendro y Madroño) y puede estar presente como metil éster en los aceites esenciales.

Dentro de los ácidos hidroxibenzoicos más importantes por sus propiedades destacan el ácido vainílico, el cual es un importante precursor del aldehído vainílico, compuesto de interés para la industria alimenticia (Bonnin *et al.*, 1999). El ácido salicílico es de interés para la industria farmacéutica. El ácido gálico se encuentra distribuido principalmente en las plantas con flores

y en algunas algas verdes. El ácido gálico se encuentra en forma de taninos hidrolizables (Waterman, 1994), los cuales serán tratados más adelante.

2.1.1.2. Ácidos hidroxicinámicos (C₆-C₃)

Los ácidos hidroxicinámicos derivan a partir del ácido cinámico (C₆-C₃), el cual se encuentra formado por un grupo acrílico (CH=CH-COOH) unido a un anillo bencénico. Entre los ácidos hidroxicinámicos más comunes se encuentran los ácidos ferúlico (4-hidroxi-3-metoxicinámico), caféico (3,4-dihidroxicinámico), *p*-cumárico (4-hidroxicinámico) y sinápico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico). Las primeras tres moléculas se encuentran representadas en la Figura 2.2.

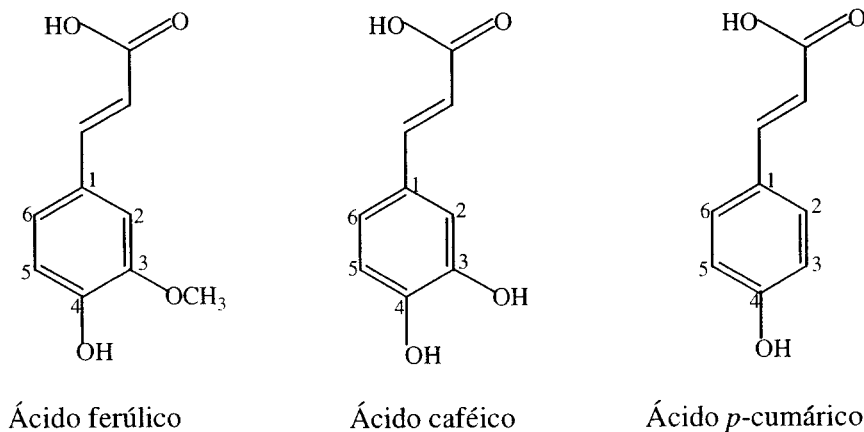


Figura 2.2. Ejemplos de diferentes tipos de ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxicinámicos ferúlico, *p*-cumárico y sinápico se encuentran comúnmente esterificados a los polisacáridos de la pared celular de las plantas superiores, en tanto que el ácido caféico se encuentra formando ésteres con el ácido quínico o con otros hidroxicinamatos (ferúlico y *p*-cumárico), los cuales forman el grupo de los ácidos clorogénicos (Clifford, 1999).

El papel de los ácidos hidroxicinámicos en las plantas incluye la protección contra la invasión de agentes patógenos y el control de la extensibilidad de la pared celular (Sancho *et al.*, 2001).

El ácido ferúlico se encuentra principalmente en el salvado de los cereales. El salvado de la cebada contiene 30 mg/Kg, mientras que el salvado de trigo contiene una mayor proporción (4000-10000 mg/Kg) y el salvado de maíz contiene mucho más (30000 mg/Kg). Se encuentra también en la fibra de la pulpa de remolacha azucarera (9000 mg/Kg) y en jugos cítricos en una menor cantidad (40-50 mg/Kg).

El ácido *p*-cumárico se encuentra principalmente en la espinaca (200 mg/Kg) y en menor proporción en el salvado de la cebada (30 mg/Kg).

El ácido sinápico se encuentra formando ésteres 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 (8-18 mg/Kg).

El ácido caféico se encuentra principalmente en la forma esterificada (ácidos clorogénicos) en el café, en la cidra, en frutas como las manzanas y los arándanos (Clifford, 1999).

El consumo de alimentos ricos en hidroxycinamatos ha mostrado efectos benéficos en la salud humana. Estos ácidos muestran múltiples propiedades *in vitro*, tales como anticancerígenas, anti-inflamatorias y antioxidantes. Esta última propiedad es de gran interés para la industria de alimentos, de cosmetología y farmacéutica (Auerbach y Gray, 1999; Saija *et al.*, 1999).

Una manera de obtener los ácidos hidroxicinámicos por vía biotecnológica, es mediante el empleo del extracto crudo o de enzimas purificadas del tipo cinamoil esterasas; las cuales permiten liberar los ácidos hidroxicinámicos a partir de productos y subproductos agrícolas como el salvado de trigo, el salvado de maíz y la pulpa de remolacha. Esta propiedad es la razón por la que estas enzimas han sido investigadas con gran interés durante los últimos años (Faulds y Williamson, 1991; Kroon y Williamson, 1999; Saulnier *et al.*, 2000).

Los ácidos ferúlico y caféico presentan efectos contrarios, el primero de regulación positiva y el segundo de represión en la producción de una enzima de este tipo, la feruoil esterasa, obtenida a partir de los cultivos de *Aspergillus niger*. Sin embargo, aún se desconoce el

mecanismo molecular de como estos procesos de estimulación y represión ocurren (Faulds y Williamson, 1996; Faulds y Williamson, 1999).

2.1.1.3. Los ácidos clorogénicos (ACG)

Uno de los primeros reportes referentes al ácido clorogénico fue publicado en 1837 por Robiquet y Boutron. Posteriormente en 1846, Payen describe el primer compuesto fenólico que se encuentra en cantidad importante dentro de los granos de café, al cual denominó ácido clorogénico, pensando que se trataba de un compuesto puro. Los trabajos de Fischer y Dangschat (1932) mostraron que el ácido clorogénico es una molécula producto de la conjugación entre el ácido caféico y el ácido quínico. Actualmente se sabe que los ácidos clorogénicos (CGA) son una familia de ésteres formados entre los ácidos hidroxicinámicos y el ácido quínico. Los ácidos clorogénicos representan un grupo complejo de moléculas que incluye no solamente ésteres del ácido caféico (5-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico y 3-cafeoilquínico), sino también ésteres de otros cinamatos (ácidos ferúlico, *p*-cumárico y sinápico), así como los ácidos dicafeoilquínico y cafeoilferuoilquínico. El más simple, presente en cantidades importantes sobre todo en el café, es el ácido 5-*O*-cafeoilquínico (5-ACQ), representado en la Figura 2.3. Este es el único disponible comercialmente y es aún llamado ácido clorogénico (Clifford, 1999).

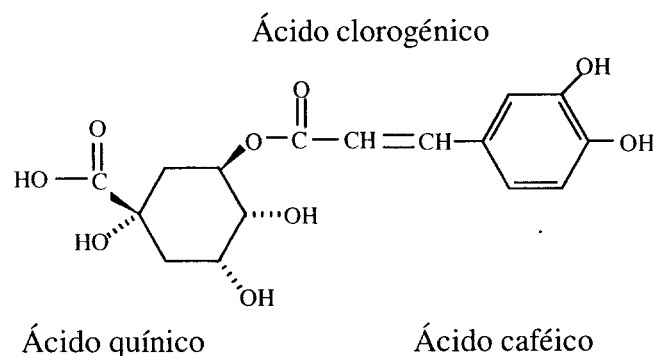


Figura 2.3. Ejemplo de un tipo de ácido clorogénico (éster de los ácidos quínico y caféico).

Los ácidos clorogénicos se encuentran principalmente en el café y sus productos (350-1000 mg/L de café *arabica*), en los arándanos (500-2000 mg/Kg) y en menor cantidad en la cidra (11-480 mg/L) y en las manzanas (62-385 mg/Kg).

El ácido clorogénico tiene propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Sin embargo, debido a sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo su alto grado hidrofílico), puede involucrar diferentes mecanismos *in vivo* y por lo tanto presentar una actividad biológica complementaria a la del ácido caféico libre (Couteau *et al.*, 2001).

Por otro lado, el ácido clorogénico, al ser utilizado en el medio de cultivo de bacterias del intestino humano, muestra un efecto positivo en la inducción de enzimas del tipo cinamoil esterasa, como es el caso de la cafeoil y feruoil esterasas (Couteau *et al.*, 2001).

2.1.2. Flavonoides y sus derivados

Se conoce como flavonoides a aquellos metabolitos que se caracterizan por contener un núcleo de 2-benzopirano, el cual contiene un anillo aromático sustituido en el C-2. De esta manera, estos compuestos tienen una estructura cíclica del tipo C₆-C₃-C₆ (Waterman, 1994). Las diferentes clases dentro del grupo se caracterizan por el grado de oxidación del anillo C (Figura 2.4) y por el número y posición de los sustituyentes hidroxílicos, metoxílicos y glicosídicos en los anillos A y B.

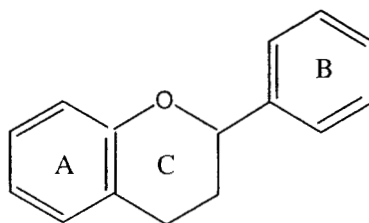


Figura 2.4. Estructura básica de los diferentes tipos de flavonoides.

Entre los tipos más comunes de flavonoides se encuentran: los flavonoles (quercetina, quercitrina y rutina), los flavan-3-oles (catequina y epicatequina), las antocianidinas (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina y malvidina) y las leucoantocianidinas (leucocianidina y leucodelphinidina).

Los flavonoides se encuentran en las plantas generalmente en forma glicosilada y no en forma libre. Los flavonoides son un grupo de fenoles relacionados con los pigmentos de las plantas, los principales responsables del color, son las antocianidinas. Éstas son responsables de los colores naranja, rojo, magenta, violeta, púrpura y azul de muchas especies de plantas y de sus productos. Esta propiedad de las antocianidinas es aprovechada en la obtención de colorantes alimenticios. Un gran número de plantas (incluyendo flores, frutos, semillas y hojas) son fuentes de antocianidinas (Hendry, 1993).

Los flavan-3-oles (catequina y epicatequina) representan un grupo importante dentro de los flavonoides. En experimentos *in vitro* e *in vivo* han mostrado efectos benéficos en la salud humana. Estos compuestos poseen propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Arts *et al.*, 2000). Fuentes importantes de catequinas, son las infusiones hechas a partir de té (102-418 mg/L) y el vino tinto (27-96 mg/L):

Tanto las antocianidinas como los flavan-3-oles, son extraídos por métodos químicos, utilizando en ambos casos solventes orgánicos como el metanol y el etanol (Arts *et al.*, 2000).

2.1.3. Fenoles poliméricos

En este grupo se encuentran la lignina y los taninos. La lignina es un polímero cuyas unidades básicas son los alcoholes coniferil, *p*-cumaril y sinapil (Figura 2.5), los cuales son derivados de los ácidos ferúlico, *p*-cumárico y sinápico, respectivamente.

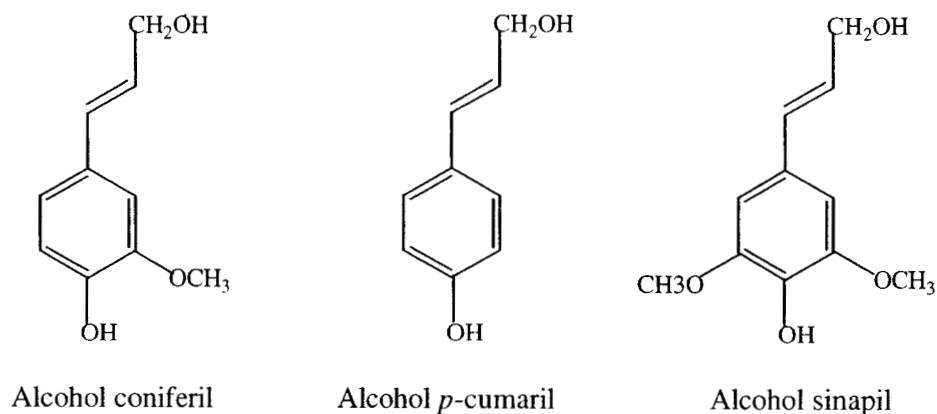


Figura 2.5. Polifenoles estructurales de la lignina.

La lignina se localiza en la pared celular secundaria de las plantas vasculares. Se encuentran de manera abundante en la madera (20-30% peso seco). Es esencial para el transporte de agua, proporciona soporte y resistencia a las enfermedades (Lapierre *et al.*, 2000).

En cuanto a los taninos, éstos constituyen un grupo de compuestos fenólicos complejos, tienen un peso molecular en el rango de 500-3000 daltones. Los taninos pueden formar complejos solubles e insolubles con las proteínas, siendo esta la principal razón de sus efectos antinutricionales (Naczk *et al.*, 2000).

Los taninos al igual que las antocianidinas, juegan un importante papel en el desarrollo del color de las flores, y así como los fenoles simples y los flavonoides, los taninos poseen propiedades biológicas como antioxidantes, las cuales han sido probadas *in vitro* (Hagerman *et al.*, 1998). Los taninos se encuentran presentes en una gran variedad de plantas herbáceas y leñosas (Haslam, 1993).

En función de su estructura y de su capacidad de reaccionar con agentes hidrolíticos, particularmente ácidos, se pueden clasificar en taninos hidrolizables y condensados. En el caso de los taninos hidrolizables, la estructura básica es el ácido gálico (Figura 2.1). Estos compuestos se caracterizan por la presencia de una hexosa, la cual se encuentra unida al ácido gálico mediante enlaces éster. Uno de los taninos hidrolizables más simples es el denominado pentagalolglucosa.

En cuanto a los taninos condensados, su estructura esta basada en la unión de una serie de monómeros de tipo flavan-3-oles, tales como la catequina y epicatequina (Arts *et al.*, 2000). Los taninos condensados, los cuales se encuentran distribuidos en el reino vegetal más ampliamente que los hidrolizables, se extraen de las fuentes naturales mediante la utilización de mezclas hechas a base de solventes tales como acetona/agua/dietil éter (Naczk *et al.*, 2000) y de mezclas de dióxido de carbono y etanol o metanol bajo, condiciones supercríticas (Murga *et al.*, 2000).

2.2. La pared celular vegetal

Esta estructura celular esta constituida por una compleja red formada por polisacáridos y ácidos hidroxicinámicos. Ambos tipos de estructuras se encuentran involucradas en el proceso de inducción de las enzimas cinamoil esterases. Enseguida se presenta una descripción de éstos polisacáridos, así como los diferentes enlaces que se presentan con los hidroxicinamatos.

2.2.1. Polisacáridos estructurales

Durante el desarrollo vegetal, las células se encuentran rodeadas de una delgada pared constituida principalmente de polímeros tales como la celulosa, la hemicelulosa y la pectina.

La celulosa es un β -(1,4)-glucano. 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.

La hemicelulosa es un polímero de pentosas, entre los que se encuentra principalmente el xilano, el cual a su vez posee cadenas laterales de arabinosa o bien otros azúcares. Este polímero se encuentran unido a la celulosa por puentes de hidrógeno (Ishii, 1997).

La pectina es un polímero complejo, se sugiere la existencia de tres estructuras distintas dentro de este polímero. Éstas son, una estructura constituida por un polímero de ácido galacturónico. Otra estructura localizada dentro del esqueleto de ácido galacturónico, la cual se basa en la repetición del disacárido formado por el ácido galacturónico y la ramnosa, el cual a su vez esta unido a través de la ramnosa a una cadena lateral formada por arabinosa y galactosa. Finalmente una tercera estructura, la cual contiene un azúcar variable (Mort *et al.*, 1989).

En las plantas dicotiledóneas la celulosa, hemicelulosa y pectina se encuentran aproximadamente en cantidades iguales, mientras que las monocotiledóneas contienen menos pectina (Ishii, 1997).

Las propiedades mecánicas de la pared celular varían en función de su composición. Las células fibrosas y vasculares contienen una delgada pared celular primaria, una gruesa y

multilaminada pared secundaria y algunas veces una pared terciaria. Muchas, pero no todas las paredes secundarias se encuentran lignificadas, alcanzando valores de 20-30 y 7-15% de lignina en paredes maduras de dicotiledóneas y monocotiledóneas, respectivamente (Ishii, 1997).

Aunque la información referente a cada uno de los diferentes polímeros individuales que constituyen la pared celular de las plantas es bastante amplia, aún no se tiene información precisa en cuanto a los enlaces covalentes que suceden entre estos polímeros para formar la compleja red de polisacáridos (Kroon y Williamson, 1999).

La pared celular en desarrollo contiene también glicoproteínas, lípidos, compuestos fenólicos estructurales (ácidos ferúlico, sinápico y cumárico) y no estructurales (flavonoides).

2.2.2. Los ácidos hidroxicinámicos en la pared celular

El empleo de técnicas como la espectroscopia UV fluorescente, ha permitido mostrar que los ácidos ferúlico, sinápico, caféico y cumárico se encuentran presentes en cantidades importantes en la pared celular de monocotiledóneas y dicotiledóneas (Kroon y Williamson, 1999). Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran unidos covalentemente a diferentes polisacáridos, tales como los arabinoxilanos, xiloglucanos y pectinas, a través de enlaces éster, los cuales han sido bien definidos (Ishii y Hiroi, 1990).

En el caso de la pared celular de los cereales (monocotiledónea), la hemicelulosa consiste principalmente de arabinoxilano, cuya estructura reside en un esqueleto formado por unidades de xilosa, unidos por enlace β -(1,4'). El esqueleto de xilosa se encuentra a su vez sustituido con residuos de α -L-arabinosil en las posiciones O-2 y/o O-3 de las unidades de xilosa (Williamson *et al*, 1998). Además, algunos de los residuos de α -L-arabinosa se encuentran sustituidos en las posiciones C-5 con moléculas de ácido ferúlico, mediante enlace éster (Figura 2.6).

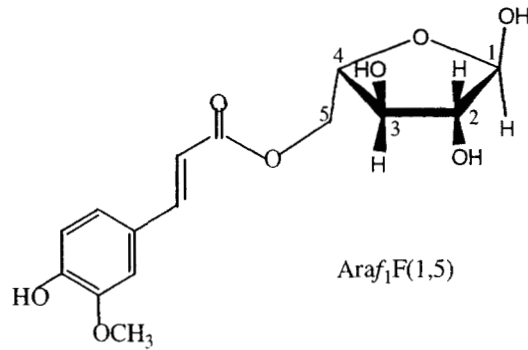


Figura 2.6. Representación del enlace éster entre el ácido ferúlico y el hidroxilo del C-5 de los residuos de α -L-arabinofuranosa, presente en el caso de las monocotiledóneas.

El ácido ferúlico se encuentra en concentraciones elevadas en la pared celular de diferentes plantas monocotiledóneas. Así por ejemplo, el salvado de trigo, el salvado de maíz y el bambú contienen aproximadamente 1-3% (p/p) de ácido ferúlico (Kroon *et al.*, 1999). En algunas especies monocotiledóneas, principalmente en la hierba costera de Bermudas (Coastal Bermuda grass, *Cynodon dactylon*), el ácido ferúlico puede estar sustituido por ácido *p*-cumárico (Borneman *et al.*, 1991).

La pared celular de algunas dicotiledóneas tales como la pulpa de remolacha y la espinaca, contienen 1% (p/p) de ácido ferúlico, el cual se encuentra esterificado con el grupo hidroxilo del C-2 de los residuos de α -L-arabinosa (Figura 2.7) o con el grupo hidroxilo del C-6 de los residuos de β -D-galactopiranososa de la cadena lateral de la molécula de pectina (Kroon *et al.*, 1999).

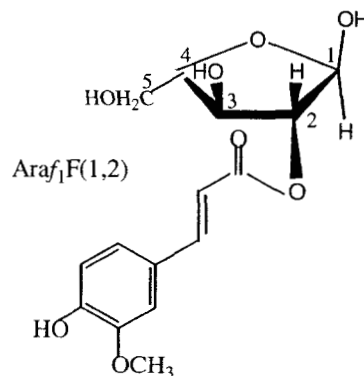


Figura 2.7. Representación del enlace éster entre el ácido ferúlico y el hidroxilo del C-2 de los residuos de α -L-arabinofuranosa, presente en el caso de las dicotiledóneas.

El ácido ferúlico tiene un importante papel en la formación de la red de polisacáridos. De acuerdo a lo reportado el ácido ferúlico forman enlaces entre los heteropolímeros de xilano y la lignina (Hatfield *et al.*, 1999).

2.3. Cinamoil ácido esterasas

El gran interés en el estudio de las enzimas del tipo cinamoil esterasas radica en su capacidad para liberar ácidos hidroxicinámicos tales como: ferúlico, caféico, *p*-cumárico y sinápico de la pared celular vegetal de productos y subproductos agrícolas tales como el salvado de maíz, cebada, salvado de trigo y pulpa de remolacha azucarera. A su vez estos ácidos hidroxicinámicos tienen aplicaciones industriales potenciales, debido a sus propiedades antioxidantes. Así mismo el ácido ferúlico presenta un segundo interés ya que es precursor de un saborizante importante, la vainillina o aldehído vainíllico. Enseguida se describen los aspectos más relevantes de estas enzimas.

2.3.1. Clasificación y características

Las cinamoil ácido esterasas son enzimas del tipo carboxil éster hidrolasas, su número de clasificación es EC 3.1.1.1. (Juge *et al.*, 2001), en donde EC significa abreviadamente Comisión de Enzimas, la primera cifra (3) representa la clase (hidrolasas), la segunda cifra (1) representa a la subclase (esterasas), la tercera cifra (1) la sub-subclase (naturaleza del sustrato: carboxilo) y la cuarta (1) designa el número de serie de la enzima en su sub-subclase.

Las cinamoil esterasas son capaces de romper los enlaces éster entre los ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, *p*-cumárico y sinápico) y los azúcares primarios (arabinosa y/o galactosa) de los polisacáridos de la pared celular vegetal, tales como hemicelulosa y pectina. Estas enzimas pueden también hidrolizar un pequeño número de ésteres de ácidos hidroxicinámicos, como el ácido clorogénico, formado por la unión de los ácidos caféico y quínico (Juge *et al.*, 2001). Las cinamoil esterasas tienen la característica de ser inducibles.

Estas enzimas son inducidas durante el crecimiento de cepas fúngicas o bacterianas sobre diferentes polisacáridos provenientes de la pared celular vegetal (lignina, hemicelulosa, celulosa y pectina), presentes en los sustratos utilizados en el medio de cultivo (Faulds y

Williamson, 1999; Kroon *et al.*, 1996). Las cinamoil esterases son secretadas al medio de cultivo para facilitar la degradación de la pared celular vegetal, la cual es utilizada enseguida como fuente de carbono (Williamson *et al.*, 1998).

2.3.2. Microorganismos que producen las cinamoil esterases

Las cinamoil esterases son producidas por un amplio rango de bacterias y hongos, tanto aerobios como anaerobios, incluyendo géneros localizados en el tracto digestivo de animales y del ser humano (Couteau *et al.*, 2001).

Los primeros trabajos referentes a estas enzimas aparecen hace pocos años. La actividad ácido ferúlico esterasa (FAE) fue detectada en los sobrenadantes de los cultivos de *Streptomyces olivochromogenes* (Johnson *et al.*, 1988) y *Schizophyllum commune* (MacKenzie y Bilous, 1988). Otra actividad, la ácido *p*-cumárico esterasa (*p*-CAE) fue detectada a partir de los cultivos provenientes de *Streptomyces viridosporus* (Deobald y Crawford, 1987; Donnelly y Crawford, 1988). Las enzimas feruoil y *p*-cumaroil esterases fueron también detectadas a partir de los sobrenadantes de los cultivos del hongo ruminal anaerobio *Neocallimastix* MC-2 (Borneman *et al.*, 1990 a, b).

Posteriormente aparece el primer trabajo que detalla la purificación y caracterización de una feruoil esterasa (4-hidroxi-3-metoxicinámico ácido esterasa), a partir del sobrenadante de los cultivos de *Streptomyces olivochromogenes* (Faulds y Williamson, 1991).

Las cinamoil esterases han sido purificadas y caracterizadas a partir de los cultivos de cepas fúngicas como: *Aspergillus oryzae* (Tenkanen *et al.*, 1991), *Neocallimastix* MC-2 (Borneman *et al.*, 1991; Borneman *et al.*, 1992), *Penicillium pinophilum* (Castanares *et al.*, 1992), *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1993) y *Aspergillus awamori* (McCrae *et al.*, 1994) y de cepas bacterianas como *Pseudomonas fluorescens* (Ferreira *et al.*, 1993).

Recientemente ha sido reportado (Couteau *et al.*, 2001) el aislamiento de bacterias del intestino humano, las cuales presentan actividad feruoil, *p*-cumaroil y cafeoil esterasa. Dentro de estas bacterias se encuentran *Escherichia coli*, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus gasseri*.

2.3.3. Fuentes de inductores de las cinamoil esterasas y condiciones de cultivo

Diferentes materiales de origen vegetal han sido empleados como fuentes de inductores de las cinamoil esterasas, entre los que se encuentran: el xilano de avena, la pulpa de remolacha azucarera, la paja de avena y la hierba costera de Bermudas. Enseguida se mencionan las principales cinamoil esterasas citadas en la literatura, así como las distintas fuentes de carbono inductoras y las condiciones de cultivo empleadas en cada caso. La Tabla 2.1 presenta un resumen de las diferentes enzimas reportadas hasta la fecha, así como las fuentes de inductores probadas en distintas cepas fúngicas y bacterianas.

Tabla 2.1. Fuentes de inductores de enzimas del tipo cinamoil esterasas, probadas en diferentes cepas fúngicas y bacterianas.

Cepa	Fuente de inductores	Condiciones de cultivo	Enzima secretada
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> (Faulds y Williamson, 1991)	Xilano de avena (Oat spelt xylan, OSX) (1%, p/v)	CML Fermentador de tanque agitado 5 L 72 h, 37°C, 200 rpm	FAE
<i>Aspergillus niger</i> CBS 120.49 (Faulds y Williamson, 1994)	Xilano de avena (OSX/ 1%, p/v)	CML Matraz 250 mL 100 mL de medio 4 días, 25°C, 150 rpm	FAE III
<i>Penicillium pinophilum</i> (Castanares <i>et al.</i> , 1992)	Paja de avena (23.1%, p/p) Salvado de trigo (9.9%, p/p)	CMS Frascos de 2 L 150 g de sustrato 12 días, 30°C	FAE p-CAE
<i>Aspergillus awamori</i> (McCrae <i>et al.</i> , 1994)	Paja de avena molida (2%, p/v)	CML Fermentador de tanque agitado 16 L 12 L de medio, 30°C	FAE p-CAE
<i>Neocallimastix</i> MC-2 (Borneman <i>et al.</i> , 1991)	Pared celular de hierba de Bermudas "Coastal Bermuda grass"(0.36%, p/v)	CML Fermentador 20L 14L, 39°C	p-CAE
<i>Neocallimastix</i> MC-2 (Borneman <i>et al.</i> , 1992)	Celulosa (2%, p/v)	CML Frascos 2L 1.75 L	FAE-I FAE-II
<i>Aspergillus niger</i> (Kroon <i>et al.</i> , 1996)	Pulpa de remolacha azucarera (1%, p/v)	CML, condiciones de FAE-III	CinnAE

De acuerdo a lo anterior, la mayor parte de las cinamoil esterasas reportadas han sido obtenidas mediante cultivos en medio líquido. La inducción de la producción de las cinamoil esterasas esta relacionada tanto con el tipo de polisacárido estructural como con los ácidos hidroxicinámicos presentes en las diferentes fuentes de carbono utilizadas. Así, el xilano de avena constituido de arabinoxilanos y en cuya estructura no se ha reportado la presencia de ácido ferúlico (Faulds y Williamson, 1996) es reportado como inductor de la producción de feruoil esterasas. Mientras que la paja de avena y el salvado de trigo, los cuales se caracterizan por su contenido en arabinoxilanos y en ácido ferúlico (Kroon *et al.*, 1999) son reportados como fuentes de inductores de la FAE y *p*-CAE. En tanto que la hierba costera de Bermudas constituida por arabinoxilanos, celulosa, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico (Ishii, 1997) es citada como fuente de inductores de la *p*-CAE. A su vez la celulosa es reportada como inductor de la FAE.

2.3.4. Sustratos de las cinamoil esterasas

Los sustratos de las cinamoil esterasas constan de dos componentes unidos mediante un enlace éster, estos componentes son el ácido hidroxicinámico y la molécula de azúcar (Williamson *et al.*, 1998). Enseguida se describen los sustratos utilizados para determinar la afinidad y la especificidad de estas enzimas.

2.3.4.1. Afinidad por el ácido hidroxicinámico

A fin de determinar la afinidad de las diferentes cinamoil esterasas por el ácido fenólico del sustrato, compuestos como los metil éster de los ácidos hidroxicinámicos han sido utilizados ampliamente en diversas investigaciones (Faulds y Williamson, 1991; Faulds y Williamson, 1996; Sancho *et al.*, 1999). En estos compuestos la parte correspondiente al azúcar, como sucede en los sustratos naturales, es reemplazada por un grupo metilo (Figura 2.8).

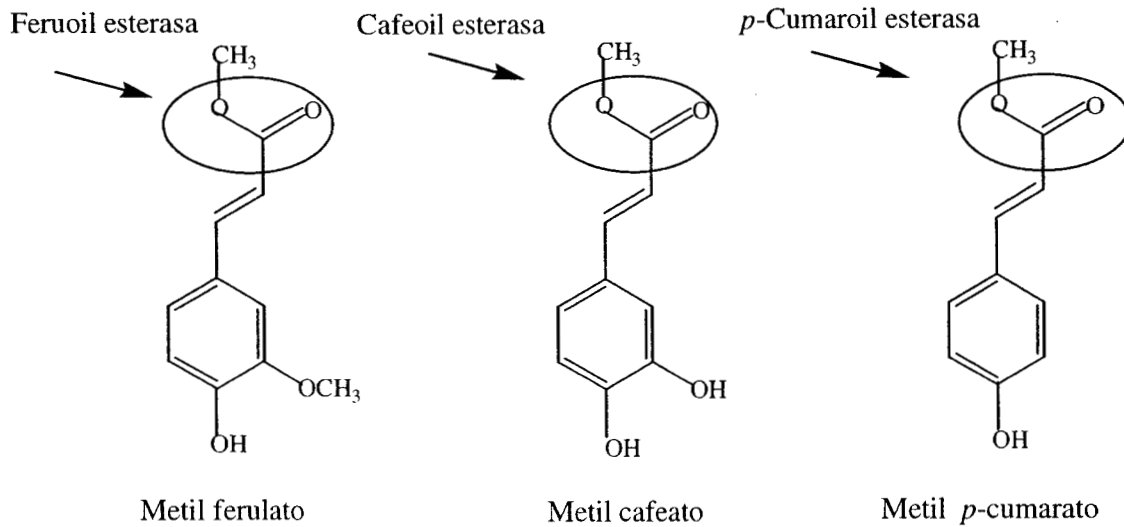


Figura 2.8. Metil ésteres de los ácidos hidroxicinámicos empleados en la medición de las actividades cinamoil esterasas.

Así, algunas cinamoil esterasas son activas principalmente sobre los feruoil ésteres (feruoil esterasas) o sobre los *p*-cumaroil ésteres (*p*-cumaroil esterasas), o sobre los cafeoil esterases (cafeoil esterasas), mientras otras presentan ya sea dos o las tres actividades mencionadas.

2.3.4.2. Especificidad por el enlace con la molécula de azúcar

La especificidad de las cinamoil esterasas por la parte correspondiente al azúcar es más complicada de analizar, ya que sólo un número limitado de sustratos se encuentran disponibles. Los sustratos utilizados son oligosacáridos cinamatados. Generalmente son obtenidos mediante hidrólisis de la pared celular de diferentes vegetales, empleando ya sea condiciones ácidas o bien mediante mezclas de enzimas (Colquhoun *et al.*, 1994). Los oligosacáridos cinamatados se pueden clasificar por su origen en dos tipos:

- A) Oligosacáridos cinamatados provenientes de plantas monocotiledóneas
- B) Oligosacáridos cinamatados provenientes de plantas dicotiledóneas

A) Oligosacáridos cinamatados provenientes de plantas monocotiledóneas:

El oligosacárido O-{5-O-[(E)-feruoil]- α -L-arabinofuranosil}-(1-3)-O- β -D-xilopiranosil-(1-4)-D-xilopiranososa (FAXX), es un ejemplo de oligosacárido feruloilado (Figura 2.9). Se ha reportado su obtención a partir de la pared celular de plantas monocotiledóneas tales como: bagazo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare*), bambú (*Phyllostahys edulis*), (Ishii, 1997) y hierba costera de Bermudas (*Cynodon dactylon*), (Borneman *et al.*, 1992).

El oligosacárido O-{5-O-[(E)-*p*-cumaroil]- α -L-arabinofuranosil}-(1-3)-O- β -D-xilopiranosil-(1-4)-D-xilopiranososa (PAXX), es otro ejemplo de oligosacárido cinamatado (Figura 2.9), es similar al FAXX, pero sustituido con un residuo de ácido *p*-cumárico. Se ha reportado su obtención a partir de la cebada, del bambú (Ishii, 1997) y de la hierba costera de Bermudas (Borneman *et al.*, 1992).

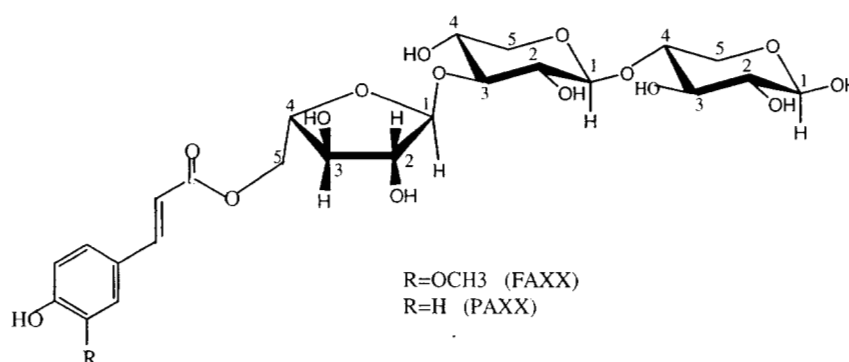


Figura 2.9. Oligosacáridos cinamatados empleados en la determinación de la especificidad por el enlace del hidroxicinamato con el hidroxilo del C-5 de la molécula del azúcar primario.

B) Oligosacáridos cinamatados provenientes de plantas dicotiledóneas

El oligosacárido [2-O-(E)-feruoil]- α -L-arabinofuranosil-(1-5)-L-arabinofuranosa (Ara₂F), es un ejemplo de oligosacárido feruloilado obtenido a partir de la pared celular de dicotiledóneas como la remolacha azucarera (*Beta vulgaris*) y la espinaca (*Spinacia oleracea*). Consiste de un ácido ferúlico unido por un enlace éster (1-2) a la arabinosa, la cual a su vez esta unida por un enlace (1-5) a otra molécula de arabinosa. El Ara₂F (Figura 2.10) es un sustrato modelo para determinar la actividad sobre los enlaces feruoil éster (1-2), (Williamson *et al.*, 1998).

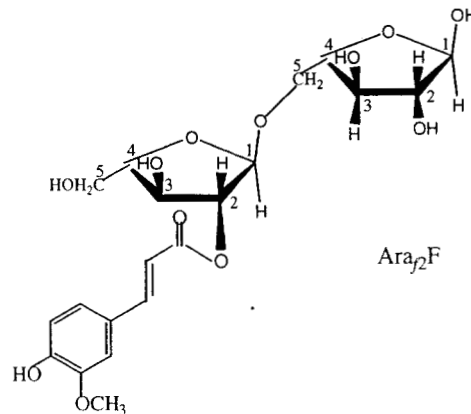


Figura 2.10. Oligosacárido feruloilado empleado en la determinación de la especificidad por el enlace del hidroxicinamato con el hidroxilo del C-2 de la molécula del azúcar primario.

Otro oligosacárido feruloilado proveniente de plantas dicotiledóneas es el O-[6-O-(E-feruoil)- β -D-galactopiranosil]-(1-4)-D-galactopiranososa (Gal₂F). 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, misma que a su vez esta unida por un enlace (1-4) a una segunda molécula de galactosa (Ishii, 1997).

La comparación entre los oligosacáridos cinamatados ha proporcionado información acerca de la posible existencia de un sitio para la molécula de azúcar en estas enzimas, mostrando igualmente la importancia de la posición de unión de los grupos fenólicos a la molécula de azúcar.

De esta manera, la hidrólisis de los oligosacáridos cinamatados presenta especificidad a determinados enlaces éster entre el ácido hidroxicinámico y el azúcar primario. Así por ejemplo, la FAE-III proveniente del sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus niger* y la *p*-CAE proveniente del sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus awamori* presentan actividad respectivamente sobre los ácido ferúlico y *p*-cumárico del FAXX y PAXX (Figura 2.11), unidos al C-5 de la arabinosa en los arabinoxilanos de los cereales, (Ralet *et al.*, 1994; McCrae *et al.*, 1994).

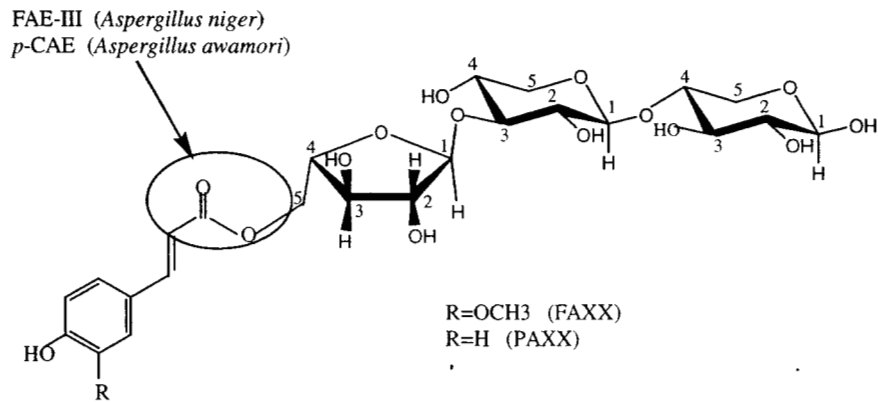


Figura 2.11. Representación del punto de hidrólisis de las enzimas FAE-III (*Aspergillus niger*) y p-CAE (*Aspergillus awamori*) sobre el enlace éster que forman los respectivos ácidos hidroxicinámicos con el hidroxilo del C5 de los residuos de arabinosa en el esqueleto de arabinoxilano.

En tanto que la CinnAE proveniente de los cultivos de *Aspergillus niger* al ser probada sobre oligosacáridos cinamatados de la pulpa de remolacha azucarera, es específica para el enlace que forma el ácido ferúlico con el C-2 de los residuos de arabinosa en la cadena de pectina (Kroon y Williamson, 1996) de la pulpa de remolacha azucarera (Figura 2.12).

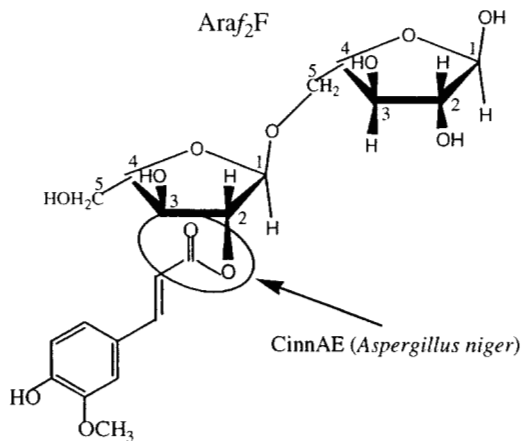


Figura 2.12. Representación del punto de hidrólisis de la enzima CinnAE (*Aspergillus niger*) sobre el enlace éster que forma el ácido ferúlico con el hidroxilo del C2 de los residuos de arabinosa de la cadena lateral de la pectina (sustrato probado Araf₂F).

La CinnAE muestra una alta actividad con el Araf₂, mientras que la FAE-III no presenta actividad sobre este sustrato (Williamson *et al.*, 1998).

La Tabla 2.2 presenta un resumen de la especificidad de sustrato mostrada por las cinamoil esterases reportadas a la fecha. .

Tabla 2.2. Sustratos empleados en la determinación de la especificidad de diferentes enzimas cinamoil esterases.

Cepa	Enzima secretada	Actividad principal	Actividad baja	No detectada
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> (Faulds y Williamson, 1991)	FAE	MFA FAXX		
<i>Aspergillus awamori</i> (McCrae <i>et al.</i> , 1994)	FAE <i>p</i> -CAE	MFA MpCM		
<i>Neocallimastix</i> MC-2 (Borneman <i>et al.</i> , 1991)	<i>p</i> -CAE	PAXX MpCM		
<i>Neocallimastix</i> MC-2 (Borneman <i>et al.</i> , 1992)	FAE-I	MFA FAXX PAXX		
<i>Neocallimastix</i> MC-2 (Borneman <i>et al.</i> , 1992)	FAE-II	MFA FAXX		
<i>Aspergillus niger</i> CBS 120.49 (Faulds y Williamson, 1994)	FAE III	MFA MSA FAXX		MCA/MpCA
<i>Aspergillus niger</i> CS 180 (Kroon <i>et al.</i> , 1996)	CinnAE	MCA/MpCA Ara ₂ F	MFA MSA	
<i>Penicillium pinophilum</i> (Castanares <i>et al.</i> , 1992)	<i>p</i> -CAE FAE	MpCM MFA		

Las enzimas FAE-I y la FAE-II son producidas por el hongo anaerobio *Neocallimastix* MC-2. La FAE-I hidroliza tanto la molécula de FAXX como el equivalente éster del ácido *p*-cumárico, el PAXX, mientras que la FAE-II es específica sólo para la hidrólisis de la molécula FAXX.

No todas las cinamoil esterases purificadas han sido probadas con los diferentes sustratos a fin de estudiar su especificidad. Sin embargo, la actividad reportada en todos los casos es la liberación de ácidos hidroxicinámicos (Williamson *et al.*, 1998).

2.3.5. Interacción de las cinamoil esterasas con otras enzimas

Solamente un número limitado de feruoil esterasas son capaces de hidrolizar directamente el ácido ferúlico a partir de la fracción insoluble de la hemicelulosa y de la pectina. Un ejemplo, la FAE-III probada sobre salvado de trigo, presenta una importante actividad específica de 3 $\mu\text{mol}/\text{min}$ por mg de salvado de trigo libre de almidón (Faulds y Williamson, 1994).

Sin embargo, la mayor parte las feruoil esterasas no son capaces de liberar por si solas el ácido ferúlico a partir del material polimérico de la pared celular (Kroon *et al.*, 1999). Por lo que es necesario que actúen en forma sinérgica con otras enzimas tales como xilanasas, arabinofuranosidasas y endoarabinanasas para facilitar la completa degradación de la pared celular vegetal (Faulds y Williamson, 1999).

2.3.5.1. Degradación de la hemicelulosa de la pared celular

La actividad de las feruoil esterasas probadas a la fecha se incrementa en forma importante con la presencia de xilanasas (Williamson *et al.*, 1998). Las xilanasas hidrolizan los enlaces $\beta(1,4)$ del xilano, pero la acción de éstas es inhibida por los residuos de arabinosil sustituidos en el esqueleto de xilano (Williamson *et al.*, 1998). De esta manera las xilanasas liberan oligosacáridos feruoilatados solubles, los cuales pueden entonces ser utilizados como sustratos de las feruoil esterasas (Saulnier *et al.*, 2000). Así mismo se ha demostrado que la presencia de las feruoil esterasas aumenta la actividad de las xilanasas sobre los arabinoxilanos (Williamson *et al.*, 1998). Este tipo de interacción sinérgica es llamada “cooperación recíproca”.

Así la FAE secretada por *Streptomyces Olivochromogenes* libera ácido ferúlico a partir del metil ferulato y en cooperación con xilanasas es capaz de liberar ácido ferúlico a partir del salvado de trigo (Faulds y Williamson, 1991).

2.3.5.2. Degradación de la pectina de la pared celular

El vegetal más estudiado para el análisis de la degradación de la pectina por cinamoil esterasas es la pulpa de remolacha. La pared celular de esta dicotiledónea contiene aproximadamente

1% de ácido ferúlico (Saulnier y Thibault, 1999). La enzima CinnAE obtenida a partir de los cultivos de *Aspergillus niger*, al actuar sobre la pulpa de remolacha azucarera solo es capaz de liberar 0.88% del total de ácido ferúlico (Kroon y Williamson, 1996). Sin embargo, una elevada actividad es observada con la presencia de dos enzimas (α -L-arabinofuranosidasa y endo-arabinanasa), las cuales pueden hidrolizar los componentes de la pectina de la pared celular. Esta interacción sinérgica requiere la presencia de ambas enzimas, ya que cuando estas carbohidrasas son incubadas con la pulpa de remolacha azucarera en forma individual, la cantidad de ácido ferúlico liberado por la CinnAE no es importante (Kroon y Williamson, 1996).

2.3.6. Aplicaciones de las cinamoil esterases y los ácidos hidroxicinámicos

En los últimos 10 años, se ha registrado un gran interés por la investigación de las cinamoil esterases, lo cual se debe a sus aplicaciones potenciales, éstas son:

1) Obtención de ácidos hidroxicinámicos (antioxidantes naturales)

La principal aplicación de las cinamoil esterases es su utilización para la obtención de ácidos hidroxicinámicos (ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico y sinápico) a partir de la pared celular de diferentes vegetales, incluyendo desechos agroindustriales tales como: salvado de maíz (Saulnier *et al.*, 2000), salvado de trigo (Ralet *et al.*, 1994), pulpa de remolacha azucarera (Kroon y Williamson, 1996), extracto de malta (Bartolomé *et al.*, 1996) y cebada (Sancho *et al.*, 1999). De esta manera se pueden obtener compuestos naturales, los cuales poseen propiedades antioxidantes.

2) En la fabricación de alimento para ganado.

En estos procesos un máximo de degradación es necesario. Las cinamoil esterases pueden actuar en colaboración con otras hidrolasas (xilanasas, arabinofuranosidasas y endo-arabinanasas) para facilitar la degradación de la pared celular vegetal, incrementando así el rendimiento total en azúcares. (Kroon y Williamson, 1999).

3) Como sondas de la pared celular vegetal

Las cinamoil esterasas pueden ser empleadas como sondas, a fin de elucidar la compleja estructura de la red de polisacáridos de la pared celular vegetal (Kroon y Williamson, 1999), proporcionando información a cerca de los componentes estructurales y funcionales en la pared celular de los vegetales.

En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, estos tienen importantes aplicaciones como antioxidantes naturales. Los ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico y sinápico son compuestos de interés en diferentes áreas tales como la industria alimentaria, en cosmetología y en medicina, debido a la capacidad que presentan de evitar y controlar el proceso de oxidación. Las propiedades antioxidantes de estos ácidos se deben a la capacidad que presentan de reaccionar con los radicales libres para interrumpir las reacciones en cadena del proceso de oxidación (Auerbach y Gray, 1999).

Los lípidos contienen ácidos grasos insaturados, los cuales reaccionan fácilmente con el oxígeno molecular. El proceso de oxidación llamado “autooxidación” se desarrolla por la reacción en cadena de los radicales libres presentes (Latif Abd *et al.*, 1999). El método más común para controlar y detener el proceso de oxidación de lípidos es mediante la utilización de moléculas con actividad antioxidante.

Los antioxidantes naturales tales como los tocoferoles (vitamina E y derivados) y el ácido ascórbico, así como los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA) y el propilgalato (PG) son capaces de donar rápidamente un átomo de hidrógeno al radical lipídico, transformándolo en un producto más estable (Ingold, 1968).

En la industria alimentaria, se utilizan antioxidantes sintéticos como el BHT, el BHA y el PG con el fin de reducir los procesos oxidativos. Sin embargo el uso de estos compuestos es objeto de serias discusiones en relación con los efectos tóxicos y carcinogénicos provocados por estos compuestos.

Actualmente los estudios se orientan hacia la utilización en la industria alimentaria de antioxidantes naturales tales como los ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, caféico, *p*-cumárico y sinápico) provenientes de fuentes naturales (Auerbach y Gray, 1999).

Las propiedades protectoras de los ácidos hidroxicinámicos en contra del daño causado en la piel por la radiación UV, hacen de estos ácidos buenos candidatos para su exitoso uso como protectores de radiación UV en la fabricación de cremas solares, lociones y cosméticos (Saija *et al.*, 1999).

Por otro lado, diferentes actividades biológicas han sido recientemente publicadas (Labat *et al.*, 2000) utilizando al ácido caféico como una molécula modelo de los compuesto fenólico simples. El ácido caféico presenta varias propiedades fisiológicas y biológicas *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio (Tabla 2.3), pero todavía no han sido completamente demostradas en el ser humano.

Tabla 2.3. Actividades fisiológicas y biológicas del ácido caféico, empleado como molécula modelo de los ácidos hidroxicinámicos.

	Actividad biológica	
Antigripal	Hepatoprotector	Antioxidante
Antiinflamatorio	Inmunoestimulante	Diurético
Antiespasmódico	Histamina-inhibidor	Protector solar
Antiviral	Antiedémico	Analgésico
Citoprotector	Antihemolítico	Anticarcinogénico
Antitumoral	Antiséptico	Antimutagénico

Fuente: Labat *et al.*, 2000

Por otro lado, el ácido ferúlico es de gran interés en la industria de los aromas. El ácido ferúlico puede ser transformado por vía microbiana (Thibault *et al.*, 1998; Gasson *et al.*, 1998) para la obtención de un compuesto de gran interés la vainilla o vainillina, obteniéndose así una “vainilla natural”.

En resumen, los ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico y sinápico por sus propiedades antioxidantes son de gran interés para la industria alimentaria. En cosmetología son empleados en la fabricación de cremas, lociones y cosméticos protectores de radiación UV y por sus

propiedades antivirales y antitumorales estos compuestos son utilizados en el campo de la medicina (Okuda *et al.*, 1992).

Por su parte, el ácido ferúlico es igualmente un importante precursor del ácido vainílico, compuesto de gran interés en la industria de aromas.

2.4. Productos y subproductos agrícolas

En esta última sección se presenta una descripción y la composición química de los diferentes productos y subproductos de origen agrícola empleados en esta investigación, como fuentes de inductores de la producción de cafeoil, feruoil y *p*-cumaroil esterasas. El salvado de trigo y la pulpa de remolacha han sido empleados en investigaciones previas (Brézillon *et al.*, 1996; Castanares *et al.*, 1992), en tanto que el trigo sin salvado y la pulpa de café no han sido utilizados.

2.4.1. El trigo

El trigo así como los demás cereales es una planta monocotiledónea, pertenece a la familia de las gramíneas y constituye el género *Triticum* (Guerrero, 1992). El grano del trigo lleva un embrión o germen junto a la sustancia de reserva (endospermo). Así mismo el grano se encuentra rodeado por tegumentos y capas de aleurona, los cuales constituyen el salvado de trigo.

Las partes constituyentes del grano (germen, endospermo y tegumentos) están formados por diferentes tejidos, variando la composición y proporciones de cada una de ellas según las distintas especies de cereales. También influyen las condiciones ambientales registradas durante el período de llenado y la maduración del grano.

El almidón es el principal carbohidrato de los cereales, en el caso del trigo constituye el 64% del peso seco del grano. La celulosa y hemicelulosa son los principales constituyentes de la pared celular del grano y junto con la lignina representa la mayor parte de la fibra bruta. También existen azúcares libres (1-3%) y compuestos fenólicos simples, principalmente el

ácido ferúlico, localizado en pared celular del grano. La composición química promedio de los granos de trigo se presenta en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Composición promedio de los granos de trigo.

Componente	(% p/p)
Proteína (N*5.7)	12.5
Grasa	2.2
Cenizas	1.9
Fibra cruda	2.8
Carbohidratos solubles	78.6
Ácido ferúlico*	0.5

Fuentes: Bellido, 1991; *(Sancho *et al.*, 2001)

En cuanto al salvado de trigo, éste presenta una mayor cantidad tanto en fibra bruta, como en ácido ferúlico (Tabla 2.5), con relación al grano de trigo (Tabla 2.4). Esta diferencia en los contenidos en fibra cruda y ácidos ferúlico en estos productos, constituye uno de los factores a evaluar en la inducción de las enzimas del tipo cinamoil esterasa, en la presente investigación.

Tabla 2.5. Composición química del salvado de trigo.

Componente	% p/p
Proteína	12.4
Grasa	3.9
Cenizas	5.9
Fibra cruda	11.1
Ácido ferúlico	0.4-0.7

Fuente: Bellido, 1991

2.4.2. La remolacha azucarera

La remolacha (*Beta vulgaris*) es una planta dicotiledónea de la familia de las Quenopodiáceas. Existen dos tipos de remolacha, la forrajera y la azucarera. Aunque la finalidad del cultivo de la remolacha azucarera es extraer el azúcar de la raíz, se obtienen subproductos de gran importancia durante el proceso de obtención del azúcar, tales como las melazas y la pulpa.

2.4.3. El café

El cafeto planta tropical dicotiledónea pertenece a la familia de las Rubiáceas, de la cual el cafeto constituye el género *Coffea*. Se conocen alrededor de 60 especies del género *Coffea* de las cuales dos son de importancia comercial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Estas dos especies son comercialmente conocidas como “arabica” y “robusta” (Sera *et al*, 2000).

El fruto del cafeto tiene el mismo aspecto exterior que el de una cereza, razón por la que se le designa como “cereza de café”. La Figura 2.13 muestra un corte longitudinal de este fruto.

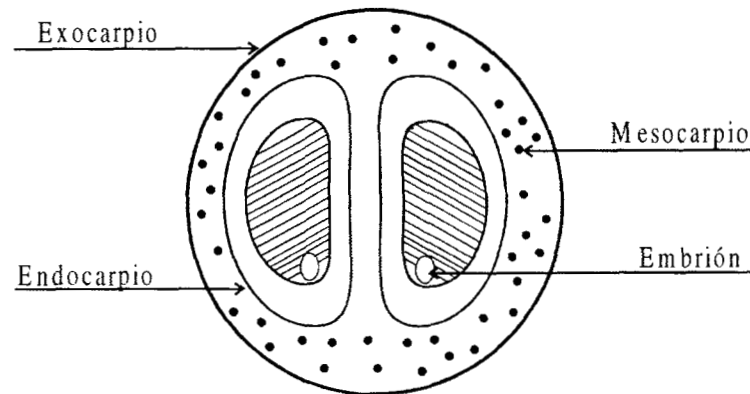


Figura 2.13. Corte longitudinal de una cereza de café.
Fuente: Perraud-Gaime, 1995

La pulpa de café es un subproducto generado durante el procedimiento de la vía húmeda para la producción de café verde. La pulpa constituye el exocarpio (epidermis) y el mesocarpio. El mesocarpio, espesa capa de tejido esponjoso de 5 mm de espesor, es rico en azúcares y pectinas, dicho tejido rodea dos granos unidos por sus lados planos.

La composición química de la pulpa de café varía de acuerdo a diferentes factores tales como: la variedad del cultivo, la composición del suelo, la etapa de madurez del fruto, las prácticas culturales y los tratamientos aplicados. La Tabla 2.7 muestra la composición general de la pulpa de café deshidratada, así como el contenido de la pared celular en la pulpa de café y los diferentes polisacáridos estructurales de la pared vegetal tales como hemicelulosa, celulosa y lignina (Bressani y Braham, 1980; Delgado-Vidal, 1999; Barreto-Castro, 2001).

Tabla 2.7. Composición química de la pulpa de café.

Componente	% p/p		
	(a)	(b)	(c)
Humedad	12.6	12.3	5.9
Proteína (N*6.25)	11.2	13.2	8.6
Azúcares solubles		33.5	
Carbohidratos			65.1
Fibra cruda			12.8
Pared celular	36.8		
Pectinas	6.5		
Lignina	17.5		
Celulosa	17.7		
Hemicelulosa	2.3		
Cafeína	1.3	0.62	0.47
Cenizas	8.3		

Fuente: Bressani y Braham, 1980 (a); Delgado-Vidal, 1999 (b); Barreto-Castro, 2001 (c).

Por otro lado con relación al contenido en compuestos fenólicos, la pulpa de café se diferencia de la pulpa de remolacha, el trigo y el salvado de trigo, en el hecho de que mientras estos productos contienen únicamente ácidos fenólicos simples, principalmente el ácido ferúlico, la pulpa de café presenta compuestos fenólicos pertenecientes a los fenoles simples, flavonoides y a los taninos. La Tabla 2.8 presenta un resumen del contenido en compuestos fenólicos determinados en la pulpa de café fresca.

Tabla 2.8. Compuestos fenólicos presentes en la pulpa de café fresca.

Nombre del compuesto fenólico	Contenido % p/p
Nombre del compuesto fenólico similar	
Ácido caféico	3.1-1.6
Ácido clorogénico (o ácido cafeoilquínico o CGA)	0.36-2.7
Ácido 3-cafeoilquínico	0.02-0.14
Ácido 4- cafeoilquínico	0.02-0.14
Ácido 5- cafeoilquínico	0.24-0.88
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	
(Ácido 3,4-isoclorogénico)	0.57
(Ácido 3,5- isoclorogénico)	1.93
(Ácido 4,5- isoclorogénico)	0.44
Ácido ferúlico	0.1
Ácido <i>p</i> -cumárico	Cantidad no determinada
Ácido protocatéquico	0.02-0.7
Ácido sinápico**	
Catequina	0.22
Epicatequina	0.2-0.44
Flavonoides	2.8-4.0
Leucoantocianidinas	
Proantocianidinas	
Taninos	1.8-8.6
Galotaninos*(taninos hidrolizables)	
Elagitaninos*(taninos hidrolizables)	

Fuente: Labat *et al.*, 2000

* = No confirmado

** = presente en el cafeto

No obstante las informaciones recientes, la totalidad de los compuestos fenólicos de la pulpa de café se encuentran lejos de ser determinados con precisión y las cifras reportadas en la literatura varían.

La pulpa de café ha sido empleada para la obtención de enzimas tales como pectinasas y celulasas (Favela *et al.*, 1989; Perraud-Gaime *et al.*, 2000). El contenido en pectina, hemicelulosa y lignina (Tabla 2.7), así como de compuestos fenólicos principalmente ácidos clorogénicos (CGA) y ácido caféico (Tabla 2.8), sugiere que la pulpa de café puede ser un sustrato adecuado para la obtención de enzimas del tipo cinamoil esterasa.

JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a lo reportado en la bibliografía, diferentes fuentes de carbono han sido utilizadas en la inducción de enzimas del tipo cinamoil esterases, dichas fuentes pueden ser clasificadas de la siguiente forma: 1) compuestos que se caracterizan por su contenido en arabinosilanos y ausencia de ácidos hidroxicinámicos como el xilano de avena; 2) compuestos con alto contenido de hemicelulosa (principalmente en forma de arabinosilanos) y ácido ferúlico como único ácido hidroxicinámico, como el salvado de trigo y la paja de avena; 3) compuestos con alto contenido en pectina y ácido ferúlico también como único hidroxicinamato, como la pulpa de remolacha azucarera; 4) compuestos con alto contenido en arabinosilanos y celulosa, así como ácidos ferúlico y *p*-cumárico, como pastos de las Bermudas (Coastal Bermuda grass) y finalmente 5) la celulosa, utilizada en forma de producto comercial.

La cinamoil esterasa más citada en la literatura es la feruol ácido esterasa (FAE). La cual es inducida al utilizar el xilano de avena, la paja de avena, el salvado de trigo, la pulpa de remolacha y la celulosa en el medio de cultivo de *Aspergillus niger* CBS 120.49, *Aspergillus awamori* IMI 142717, *Penicillium pinophilum* CMI 87160ii, *Aspergillus niger* CS 180 (enzima denominada como CinnAE) y *Neocallimastix* MC-2 respectivamente. La FAE ha sido ampliamente estudiada y caracterizada mediante el empleo de diferentes sustratos enzimáticos como el metil ferulato y oligosacáridos feruloilátados. Otra cinamoil esterasa estudiada aunque en menor grado es la *p*-cumaroil esterasa (*p*-CAE), obtenida al utilizar la paja de avena, el salvado de trigo y la hierba costera de Bermudas (Coastal Bermuda grass), como fuentes de carbono en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* IMI 142717, *Penicillium pinophilum* y *Neocallimastix* MC-2 respectivamente. La *p*-CAE esterasa ha sido también caracterizada con sustratos similares a los utilizados para la feruol esterasa.

Sin embargo, una cinamoil esterasa que ha sido poco estudiada es la cafeoil ácido esterasa (CAE). Solamente *Aspergillus niger* CS 180 es reportada con la capacidad producir una cinamoil esterasa (CinnAE), al utilizar la pulpa de remolacha azucarera en el medio de cultivo. Esta enzima presenta una importante actividad sobre el metil cafeato. En algunas investigaciones esta actividad ha sido cuantificada utilizando como en el caso anterior al metil

cafeato como sustrato enzimático, mientras que en otras investigaciones esta actividad simplemente no ha sido medida.

Dada la poca información con relación a la actividad cafeoil esterasa reportada en la literatura y dada la importancia de esta enzima para la liberación de un importante antioxidante y anticarcinogénico natural como el ácido caféico, se propone la presente investigación. La cual busca contribuir de manera particular al estudio de la cafeoil ácido esterasa, utilizando a *Aspergillus awamori* NRLL 3112. Esta cepa fue seleccionada en esta investigación por su capacidad de utilizar al xilano de avena como inductor de la producción de cafeoil esterasa I (CAE-I), utilizando al ácido clorogénico como sustrato enzimático.

Así mismo y dado que sustratos como el xilano de avena, el salvado de trigo, el trigo sin salvado y la pulpa de remolacha no han sido utilizados en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* para la producción de cafeoil, feruoil, y *p*-cumaroil esterasas, se propone su estudio. Igualmente se propone el estudio de otras dos fuentes de carbono no reportadas en la literatura el trigo sin salvado y la pulpa de café en la producción de dichas actividades. El trigo desprovisto de salvado es utilizado a fin de evaluar la falta de un componente rico en arabinosilanos y en ácido ferúlico como es el salvado de trigo, en la producción de las cinamoil esterasas buscadas. En cuanto a la pulpa de café, ésta fue seleccionada ya que contiene principalmente pectina y lignina como componentes estructurales de la pared celular, lo cual sugiere que este subproducto pueda ser un sustrato para la producción de cafeoil, feruoil y *p*-cumaroil esterasas. Así mismo a diferencia de los compuestos utilizados en investigaciones previas, la pulpa de café contiene ácido caféico y ácidos clorogénicos los cuales han sido escasamente estudiados en los niveles de producción de las enzimas cafeoil, feruoil y *p*-cumaroil esterasas.

Por otro lado en cuanto a la actividad cafeoil esterasa, se propone el empleo de dos ésteres de cafeato diferentes, como sustratos para la medición de las actividades cafeoil esterasa. Éstos son el metil cafeato que ha sido poco estudiado y el ácido clorogénico, escasamente utilizado para la medición de la actividad cafeoil esterasa.

De esta manera esta investigación esta dirigida a evaluar el efecto del xilano de avena, salvado de trigo, trigo sin salvado, pulpa de remolacha y pulpa de café como fuentes de inductores sobre la producción de cafeoil I, cafeoil-II, feruoil y *p*-cumaroil esterasas por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, empleando los siguientes sustratos enzimáticos: ácido clorogénico, metil cafeato, metil ferulato y metil *p*-cumarato respectivamente..

En esta forma el presente trabajo busca contribuir al estudio de las enzimas del tipo cinamoil esterasas. A fin de permitir su aplicación, es decir la liberación de antioxidantes y anticarcinogénicos naturales como los ácidos caféico, ferúlico y *p*-cumárico a partir de productos y subproductos agrícolas, como el salvado de trigo, la pulpa de remolacha y la pulpa de café.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la producción fúngica de cafeoil ácido esterasa I (CAE-I), cafeoil ácido esterasa II (CAE-II), feruoil ácido esterasa (FAE) y *p*-cumaroil ácido esterasa (*p*-CAE).

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Establecer una técnica analítica para la medición de las actividades CAE-I, CAE-II, FAE y *p*-CAE, utilizando los siguientes sustratos enzimáticos: ácido clorogénico, metil cafeato, metil ferulato y metil *p*-cumarato respectivamente.
- 4.2.2. Seleccionar al menos una cepa fúngica capaz de utilizar al xilano de avena como inductor de la producción de cafeoil esterasa I.
- 4.2.3. Evaluar los tipos de sustrato: tipo cereal, pulpa de remolacha y pulpa de café que presenten los mayores niveles sobre la producción de cafeoil esterasa I, cafeoil esterasa II, feruoil esterasa y *p*-cumaroil esterasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Fuentes de inductores probadas

Todas las fuentes de inductores empleadas a excepción del xilano de avena fueron sometidas a un proceso de molienda, el diámetro promedio de las partículas es indicada en cada caso.

- 1) Xilano de grano de avena espelta (Oat Spelt Xylan, OSX), (Fluka, Biochemika).

- 2) Trigo precocido sin salvado (producto comercial de origen francés: Ebly).
Diámetro promedio de las partículas: 0.015 mm.

- 3) Salvado de trigo (subproducto de origen francés).
Diámetro promedio de las partículas: 2 mm.

- 4) Pulpa de remolacha azucarera deshidratada (subproducto de origen francés).
Proporcionada por Agro-Industrie Recherches et Développements (ARD). Pomacle (France).
Diámetro promedio de las partículas: 2 mm.

- 5) Pulpa de café fresca y liofilizada (*Coffea arabica*, subproducto proveniente del estado de Veracruz, México).
Diámetro promedio de las partículas: 0.015 mm.

- 6) Pulpa de café ensilada y liofilizada (*Coffea arabica*, subproducto proveniente de los silos ubicados en el estado de Veracruz, México.).
Diámetro promedio de las partículas: 0.015 mm.

5.2. Microorganismos

Las siguientes cepas fúngicas fueron utilizadas:

1) *Pencillium commune* V33A25. Cepa aislada del café. Colección: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F./Institut de Recherche pour le développement, Francia).

2) *Aspergillus niger* Aa20. Colección: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F./Institut de Recherche pour le développement, Francia).

3) *Aspergillus awamori* NRRL3112. Colección: Agricultural Research Service Culture Collection.

5.3. Conservación de las cepas

La conservación de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, *Pencillium commune* V33A25 y *Aspergillus niger* Aa20 se realizó mediante tubos de almacenamiento Cryoblock (conservación a largo plazo mediante “bead storage system”, Technical Service Consultants Limited).

El procedimiento para la conservación fue el mismo para las tres cepas. Cada cepa fue inoculada en 3 matraces de 250 mL conteniendo 30 mL de medio Papa Dextrosa Agar (PDA). Se incubó a 30°C, durante 5 días, una vez que la cepa esporuló, se procedió a la cosecha de las esporas, utilizando 15 mL de solución fisiológica estéril con tween 80 (0.01%). La solución fisiológica conteniendo las esporas de los 3 matraces fue repartida en tubos de Eppendorf, los cuales fueron centrifugados a 10000 g durante 7 min, enseguida el sobrenadante fue desechado y las esporas localizadas en el fondo de los tubos Eppendorf fueron recuperadas y depositadas en condiciones estériles en un tubo de almacenamiento Cryoblock, el cual fue almacenado a -20°C.

5.4. Propagación de las cepas

La propagación de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, *Pencillium commune* V33A25 y *Aspergillus niger* Aa20 fue efectuada utilizando esferas de los tubos de almacenamiento Cryoblock. El procedimiento fue el mismo para cada una de las cepas. La primera réplica fue realizada en matraces de 250 mL conteniendo 30 mL de medio PDA. El medio inoculado con una esfera del tubo de almacenamiento Cryo-block fue incubado a 30°C durante 5 días, una vez obtenida la esporulación, una segunda réplica fue efectuada en PDA. Para la inoculación de las esporas al medio de cultivo, la segunda réplica fue sistemáticamente utilizada.

5.5. Preparación del cultivo

5.5.1. Suspensión de esporas

La segunda réplica de la cepas *Aspergillus awamori* NRRL 3112, *Pencillium commune* V33A25 y *Aspergillus niger* Aa20 fue utilizada. La recuperación de esporas se realizó con la adición de 30 mL de agua estéril con Tween 80 (0.01%), mediante la ayuda de un agitador magnético. La suspensión de esporas obtenida fue vaciada sucesivamente a uno o más matraces conteniendo esporas a fin de concentrar la suspensión. El conteo de esporas fue efectuado en una cámara de Malasses.

5.5.2. Composición del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo fue la siguiente: fuente de carbono (concentración según la Tabla 5.1), glucosa (10 g/L), extracto de levadura (0.5 g/L) tartrato de diamonio (1.842 g/L), KH_2PO_4 (0.2 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.0132 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.5 g/L) y Tween 80 (0.05 g/L).

Tabla 5.1. Fuentes de carbono inductoras provenientes de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

Fuentes de inductores:	Concentración (% p/v)
Material proveniente de plantas monocotiledóneas:	
Xilano de avena	1.5
Xilano de avena con adición de ácido ferúlico	1.5
Trigo	0.03
Salvado de trigo	1.5
Material proveniente de plantas dicotiledóneas:	
Pulpa de remolacha azucarera	1.5
Pulpa de café fresca y liofilizada	1.5
Pulpa de café ensilada y liofilizada	1.5
Pulpa de café ensilada y liofilizada	0.5

En todos los cultivos se utilizó una concentración de 1.5% p/v, salvo para la pulpa de café ensilada y liofilizada, en donde una concentración de 0.5% p/v fue también probada. Esta baja concentración en pulpa de café ensilada, se utilizó considerando que los productos de fermentación del ensilaje, tales como los ácidos láctico y acético, podrían ser tóxicos para el crecimiento de *Aspergillus awamori* y en consecuencia disminuir la producción de las enzimas del tipo cinamoil esterasas.

El ácido ferúlico fue adicionado con la finalidad evaluar su efecto en los niveles de producción de las actividades cinamoil esterasas buscadas.

5.5.3. Preparación del medio e inoculación

Los cultivos fueron realizados en matraces de 500 mL bafleados. El volumen de medio por matraz fue de 100 mL. Dentro de cada matraz fue agregada la fuente de inductor indicada (Tabla 5.1), 1 g de glucosa y 85 mL de agua MilliQ. Esta mezcla fue esterilizada a 110°C durante 30 min.

Por separado, fueron preparadas soluciones madre de cada uno de los constituyentes, las cuales fueron esterilizadas a 110°C durante 30 min. En condiciones estériles fueron agregados a cada matraz de 500 mL cada uno de los constituyentes, en el volumen necesario para tener en el medio de cultivo la concentración antes indicada. Una vez incorporados todos los constituyentes, se adiciono la cantidad de suspensión de esporas necesaria para tener una concentración de 4×10^6 esporas/mL de medio de cultivo. Los cultivos fueron incubados a 30°C, con agitación (120 rpm).

Para el caso en que se utilizó en el medio de cultivo la combinación xilano de avena y ácido ferúlico, 3 mL de una solución (10 mg/mL) de ácido ferúlico, previamente filtrada por una membrana 0.22 μ m fue agregada al medio de cultivo antes o después de la adición del resto de los constituyentes, obteniendo así una concentración final en el medio de 0.03% p/v en ácido ferúlico y 1.5% p/v en OSX (Tabla 5.1). La preparación de la solución de ácido ferúlico se realizó de la siguiente forma:

Preparación de 100 mL de solución de ácido ferúlico 10 g/L.

1 g de ácido ferúlico fue agregado en 50% (50 mL) del volumen total de la solución a preparar. Con ayuda de un agitador magnético, fue agregada lentamente gota a gota una solución de NaOH (30%) hasta llegar a un pH de 7.2, alcanzando así la disolución total de ácido ferúlico. La solución fue aforada hasta alcanzar el volumen final. Enseguida la solución fue filtrada por una membrana de 0.22 μ m y recuperada en un frasco ámbar lista para su utilización. La solución de ácido ferúlico puede ser conservada en refrigeración durante 2 meses.

5.6. Obtención del sobrenadante

Cada día, 3 mL del medio de cultivo fueron retirados y colectados en tubos Eppendorf de 1.5 mL. El micelio fue separado por centrifugación a 12000 g a 4°C, después el sobrenadante fue filtrado por una membrana de 0.22 µm y enseguida fue analizado.

5.7. Técnicas analíticas

5.7.1. Conteo de esporas

Para el conteo de esporas se utilizó una cámara de Malassez y un microscopio Olympus CH2, el número de esporas fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas /mL} = (\text{promedio de esporas de los 25 cuadros}) * (1 \times 10^5) * (\text{dilución})$$

5.7.2. Medición de las actividades cinamoil esterasas por espectrofotometría en el UV

Para la medición de las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumároil esterasas se desarrollo una técnica analítica por espectrofotometría en el ultravioleta. Dicha técnica se presenta en la sección 6.1 de resultados y discusiones. Los compuestos utilizados para este procedimiento se presentan en la Tabla 5.2. Para las mediciones de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A con margen de variación de 2 nm y con control de temperatura a 37°C.

Tabla 5.2. Compuestos empleados en el desarrollo de la técnica para la medición de las actividades cinamoil esterasas.

Actividad cinamoil esterasa	Sustrato	Producto
(CAE-I)	Ácido clorogénico (CGA) ^a	Ácido caféico ^c
(CAE-II)	Metil cafeato (MCA) ^b	Ácido caféico ^c
(FAE)	Metil ferulato (MFA) ^b	Ácido ferúlico ^c
(<i>p</i> -CAE)	Metil <i>p</i> -cumarato (MpCA) ^b	Ácido <i>p</i> -cumárico ^c

^aSigma, Chemical; ^bApin Chemicals, UK; ^cFluka BioChemika

En la medición de las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterasas se prepararon soluciones de los sustrato correspondientes (Tabla 5.2) a una concentración de

1.18 mM utilizando como amortiguador el ácido 3-morfolino-propanosulfónico (MOPS, Fluka BioChemika) a 100 mM y pH 6. Cada sustrato fue disuelto previamente en etanol (500 μ L de etanol para un volumen final de 50 mL de la solución 1.18 mM). Las soluciones fueron guardadas en frascos, protegidas de la luz y conservadas en refrigeración hasta su utilización. Las soluciones de sustrato pueden ser almacenadas hasta por 2 meses en refrigeración. La cuantificación de las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterases se realizó de acuerdo al procedimiento establecido en la sección 6.1.

5.8. Estrategia experimental

5.8.1. Selección de la cepa

El criterio de selección, se basa en la capacidad de utilizar el xilano de avena como inductor de la cafeoil esterasa I. Dado que los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium* son reportados con la capacidad de producir enzimas del tipo cinamoil esterasa, 2 cepas del primer género y una del segundo fueron utilizadas.

De esta manera las siguientes cepas fueron estudiadas considerando así mismo las siguientes características: *Penicillium commune* V33A25, la cual es capaz de producir pectinasas y de utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno; *Aspergillus niger* Aa-20, capaz de producir tanasa y *Aspergillus awamori* NRRL 3112, estudiada por la capacidad de esta especie de producir cinamoil esterases.

Para la selección se efectuaron cultivos por triplicado para cada una las 3 cepas, utilizando al xilano de avena (1.5% p/v) como inductor. La actividad cafeoil esterasa I se midió utilizando al ácido clorogénico como sustrato enzimático.

5.8.2. Efecto de la fuente de carbono sobre la producción de cafeoil, feruoil y *p*-cumaroil esterases por la cepa seleccionada, *Aspergillus awamori* NRRL 3112

A fin de evaluar efecto de la fuente de carbono en las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterases, 8 cultivos fueron realizados. Las fuentes de carbono utilizadas se pueden clasificar para su estudio en 5 grupos:

- A) Producto con alto contenido en arabinosilanos y ausencia de ácidos hidroxicinámicos:
- 1) Xilano de avena
- B) Productos con alto contenido en arabinosilanos y ácido ferúlico como único hidroxicinamato:
- 2) Xilano de avena + ácido ferúlico
 - 3) Salvado de trigo
- C) Producto con bajo contenido en arabinosilanos y en ácido ferúlico:
- 4) Trigo sin salvado
- D) Producto con alto contenido en pectina, celulosa y ácido ferúlico como único hidroxicinamato:
- 5) Pulpa de remolacha azucarera
- E) Productos con pectina y alto contenido en celulosa, lignina, ácido clorogénico y caféico.
- 6) Pulpa de café fresca
 - 7) Pulpa de café ensilada
 - 8) Pulpa de café ensilada (0.5% p/v)

Los 8 cultivos fueron realizados por triplicado. Las 4 actividades cinamoil esterasa: cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil fueron medidas en el sobrenadante proveniente de cada uno de los 8 cultivos realizados.

5.9. Expresión de resultados

Las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterasas se encuentran expresadas como actividad volumétrica (U/mL). La actividad es multiplicada por 10^3 , lo cual proporciona la cifra indicada en el eje de actividad de las figuras. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de producto (ácido caféico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico) por minuto a 37°C y pH 6.

La productividad (P) es obtenida al dividir el valor máximo de actividad cinamoil esterasa correspondiente, entre el tiempo (días) necesario para alcanzar dicha actividad.

5.10. Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS-9. Un análisis de varianza fue efectuado entre las diferentes fuentes de carbono utilizadas para la inducción de las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterasas. Para la comparación entre las diferentes fuentes de carbono empleadas en la inducción de cada una de las 4 actividades mencionadas, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Tanto en el ANOVA como en la prueba de Tukey, el nivel de significancia utilizado fue de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Establecimiento de una técnica de cuantificación de actividad enzimática con la medición simultánea de sustrato y producto por espectrofotometría en el UV

Para la medición de las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil estererasas se estableció una técnica analítica por espectrofotometría en el ultravioleta. Enseguida se presenta el principio y el procedimiento matemático empleados.

6.1.1. Principio y procedimiento matemático

La técnica se basa en el análisis de dos componentes en una mezcla, mediante el planteamiento y resolución de dos ecuaciones simultáneas para cada una de las actividades enzimáticas. Por lo que 8 ecuaciones fueron planteadas. En dichas ecuaciones las incógnitas son la concentración de sustrato que se consume (C_1) y la concentración de producto formado (C_2). El sistema de ecuaciones relaciona absorbancias (A) y coeficientes de extinción molar o absorptividades (ϵ) de los componentes de la mezcla a analizar.

Para el planteamiento del sistema de ecuaciones, se considera que ambos compuestos siguen la ley de Beer y que las absorbancias son aditivas (Ayres, 1970).

$$\text{Ley de Beer: } A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} b C \quad \dots\dots(1)$$

Donde:

A, es la absorbancia a una determinada longitud de onda (λ)

ϵ , es el coeficiente de extinción molar o absorptividad [=] $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

b, es la longitud de la celda (1 cm)

C, es la concentración [=] mM

Considerando que en la mezcla de reacción, las absorbancias son aditivas. Se plantea el siguiente sistema de ecuaciones para cada una de las actividades enzimáticas:

$$A_{\lambda_1} = (\epsilon_1)_{\lambda_1} C_1 + (\epsilon_2)_{\lambda_1} C_2 \dots \dots \dots (2)$$

$$A_{\lambda_2} = (\epsilon_1)_{\lambda_2} C_1 + (\epsilon_2)_{\lambda_2} C_2 \dots \dots \dots (3)$$

Donde:

λ_1 y λ_2 = Longitudes de onda de absorción máxima de los componentes 1 y 2.

A_{λ_1} = Valor de absorbancia total de la mezcla a λ_1

A_{λ_2} = Valor de absorbancia total de la mezcla a λ_2

$(\epsilon_1)_{\lambda_1}$ = Coeficiente de extinción molar del componente 1 a λ_1

$(\epsilon_1)_{\lambda_2}$ = Coeficiente de extinción molar del componente 1 a λ_2

$(\epsilon_2)_{\lambda_1}$ = Coeficiente de extinción molar del componente 2 a λ_1

$(\epsilon_2)_{\lambda_2}$ = Coeficiente de extinción molar del componente 2 a λ_2

C_1 y C_2 = Concentraciones de los componentes 1 y 2

El cálculo de los coeficientes de extinción molar (ϵ) de los dos componentes a las dos longitudes de onda máximas de cada componente se efectúa a partir de la ecuación (1). De esta manera se tiene:

$$(\epsilon_1)_{\lambda_1} = A_{1\lambda_1}/C_1 \dots \dots \dots (4)$$

$$(\epsilon_2)_{\lambda_1} = A_{2\lambda_1}/C_2 \dots \dots \dots (6)$$

$$(\epsilon_1)_{\lambda_2} = A_{1\lambda_2}/C_1 \dots \dots \dots (5)$$

$$(\epsilon_2)_{\lambda_2} = A_{2\lambda_2}/C_2 \dots \dots \dots (7)$$

Donde:

ϵ_1 = Coeficiente de extinción molar del componente 1

ϵ_2 = Coeficiente de extinción molar del componente 2

$A_{1\lambda_1}$ = Absorbancia del componente 1 a λ_1

$A_{1\lambda_2}$ = Absorbancia del componente 1 a λ_2

$A_{2\lambda_1}$ = Absorbancia del componente 2 a λ_1

$A_{2\lambda_2}$ = Absorbancia del componente 2 a λ_2

La resolución del sistema de ecuaciones 2 y 3 da como resultado las siguientes ecuaciones:

$$C_1 = \frac{(\epsilon_2)_{\lambda_2} A_{\lambda_1} - (\epsilon_2)_{\lambda_1} A_{\lambda_2}}{(\epsilon_1)_{\lambda_1} (\epsilon_2)_{\lambda_2} - (\epsilon_2)_{\lambda_1} (\epsilon_1)_{\lambda_2}} \dots\dots\dots(8) \quad C_2 = \frac{(\epsilon_1)_{\lambda_1} A_{\lambda_2} - (\epsilon_1)_{\lambda_2} A_{\lambda_1}}{(\epsilon_1)_{\lambda_1} (\epsilon_2)_{\lambda_2} - (\epsilon_2)_{\lambda_1} (\epsilon_1)_{\lambda_2}} \dots\dots\dots(9)$$

Los valores de coeficientes de extinción molar calculados, son sustituidos en las ecuaciones 8 y 9, teniendo así las ecuaciones que permiten el cálculo de la concentración de sustrato consumido (C_1) y de producto formado (C_2) en una muestra problema.

6.1.2. Establecimiento de la técnica

Para determinar el par de ecuaciones que permitan conocer la concentración de sustrato (C_1) y de producto (C_2) para cada una de las actividades enzimáticas, se utilizaron los compuestos (componentes) mostrados en la Tabla 6.1.

Tabla 6.1. Componentes empleados en la determinación de las ecuaciones para el cálculo de la concentración de sustrato y de producto de cada actividad cinamoil esterasa.

Actividad cinamoil esterasa	Componente 1 = sustrato	Componente 2 = producto
Cafeoil I (CAE-I)	Ácido clorogénico (CGA)	Ácido caféico
Cafeoil II (CAE-II)	Metil cafeato (MCA)	Ácido caféico
Feruoil (FAE)	Metil ferulato (MFA)	Ácido ferúlico
<i>p</i> -Cumaroil (<i>p</i> -CAE)	Metil <i>p</i> -cumarato (MpCA)	Ácido <i>p</i> -cumárico

La primera etapa del establecimiento de la técnica, consiste en la determinación de las longitudes de onda máximas de cada componente, para lo cual se efectuaron los espectros de absorción de cada componente.

Se partió de soluciones madre de cada componente a una concentración de 1.18 mM, utilizando como amortiguador al ácido 3-morfolino-propanosulfónico (MOPS) a 100 mM y pH 6. Para realizar los espectros de absorción cada solución fue diluida a las siguientes concentraciones: $C_1 = 0.0236$ mM y $C_2 = 0.0295$ mM para los componentes 1 y 2 respectivamente. Los espectros de absorción (Figura 6.1), muestran los valores de longitud de onda máximas ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorción.

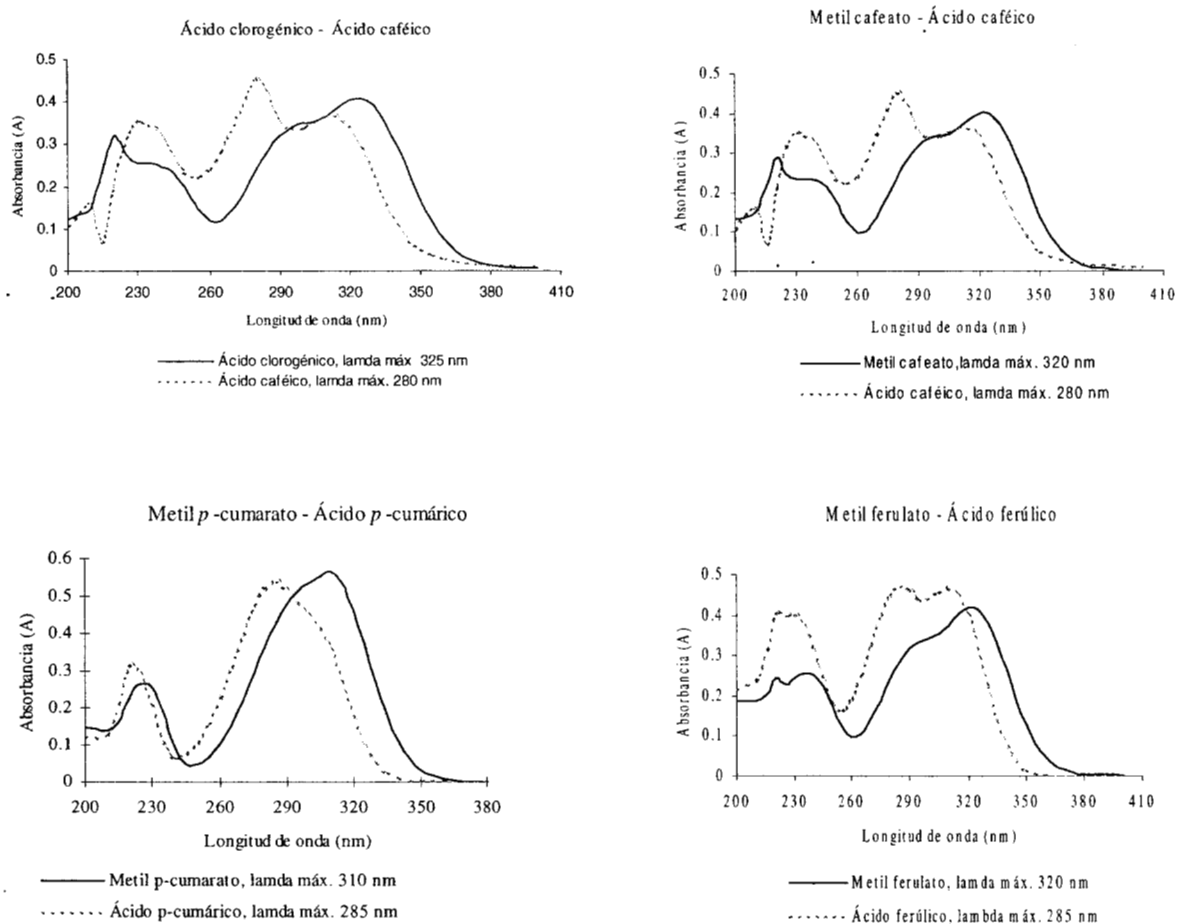


Figura 6.1. Espectros de absorción de los ácidos libres y esterificados empleados para la determinación de las diferentes actividades cinamoil esteratas.

La segunda etapa consiste en el cálculo de los coeficientes de extinción molar de cada componente, utilizando las formulas 4,5,6 y 7.

Los valores de longitud de onda máximas ($\lambda_{\text{máx}}$) de absorción de los ácidos libres y esterificados, así como los coeficientes de extinción molar (ϵ) calculados se muestran en la Tabla 6.2. Los valores obtenidos coinciden con los reportados por Faulds y Williamson, 1994.

Tabla 6.2. Longitudes de onda máximas de absorción ($\lambda_{\text{máx}}$) y coeficientes de extinción molar (ϵ) determinados siguiendo la ley de Lambert y Beer.

Actividad	Sustrato Producto	$\lambda_{\text{máx}}$ de absorción* (nm)	ϵ (mM ⁻¹ cm ⁻¹)*
Cafeoil esterasa I	Ácido clorogénico (CGA)	325	16.65
		280	11.74
	Ácido caféico	325	9.89
		280	16.24
Cafeoil esterasa II	Metil cafeato (MCA)	320	16.86
		280	12.03
	Ácido caféico	320	13.60
		280	16.07
Feruoil esterasa	Metil ferulato (MFA)	320	17.75
		285	12.03
	Ácido ferúlico	320	13.49
		285	15.93
<i>p</i> -Coumaroil esterasa	Metil <i>p</i> -cumarato (MpCA)	310	24.05
		285	18.14
	Ácido <i>p</i> -cumárico	310	12.10
		285	18.27

Valores determinados a pH 6 en amortiguador MOPS 100mM*

Los coeficientes de extinción molar son sustituidos en las ecuaciones 8 y 9. Obteniendo así las ecuaciones que se presentan en la Tabla 6.3, las cuales permiten cuantificar las 4 actividades enzimáticas. Estas ecuaciones fueron validadas mediante la simulación de mezclas de reacción, usando diferentes concentraciones de sustrato y producto.

Dado que el sobrenadante de la muestra problema presenta absorbancia a las longitudes de onda de medición de las distintas actividades, es necesario realizar la corrección de la absorción por el sobrenadante. Por lo que al valor de absorbancia total registrado en la muestra a cada una de las longitudes máximas de absorción de los dos componentes, debe ser restado el valor de absorbancia del sobrenadante en cada longitud de onda máxima.

$$Ac_{\lambda_1} = A_{m\lambda_1} - As_{\lambda_1}$$

$$Ac_{\lambda_2} = A_{m\lambda_2} - As_{\lambda_2}$$

Donde:

Ac_{λ_1} = Absorbancia corregida a λ_1

Ac_{λ_2} = Absorbancia corregida a λ_2

$A_{m\lambda_1}$ = Absorbancia de la muestra a λ_1

$A_{m\lambda_2}$ = Absorbancia de la muestra a λ_2

As_{λ_1} = Absorbancia del sobrenadante de la muestra a λ_1

As_{λ_2} = Absorbancia del sobrenadante de la muestra a λ_2

Una vez hecha esta corrección, las ecuaciones presentadas en la Tabla 6.3 pueden ser utilizadas para el cálculo de la concentración de sustrato consumido o de producto formado para cada una de las reacciones enzimáticas:

Tabla. 6.3. Ecuaciones utilizadas en el cálculo de la concentración de sustrato consumido y de producto formado para la determinación de las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterases.

Actividad	Ecuaciones
Cafeoil esterasa I	Ácido clorogénico – Ácido caféico $C_1 = (16.24*Ac_{325} - 9.89*Ac_{280})/154.26$ $C_2 = (16.65*Ac_{280} - 11.74*Ac_{325})/154.26$
Cafeoil esterasa II	Metil cafeato - Ácido caféico $C_1 = (16.07*Ac_{320} - 13.6*Ac_{280})/107.39$ $C_2 = (16.86*Ac_{280} - 12.03*Ac_{320})/107.39$
Feruoil esterasa	Metil ferulato –Ácido ferúlico $C_1 = (15.93*Ac_{320} - 13.49*Ac_{285})/120.49$ $C_2 = (17.75*Ac_{285} - 12.03*Ac_{320})/120.49$
<i>p</i> -Cumaroil esterasa	Metil <i>p</i> -cumarato –Ácido <i>p</i> -cumárico $C_1 = (18.27*Ac_{310} - 12.10*Ac_{285})/219.5$ $C_2 = (24.05*Ac_{285} - 18.14*Ac_{310})/219.5$

C_1 = Concentración de sustrato consumido [=] mM; C_2 = Concentración de producto formado [=] mM; Ac = Absorbancia corregida a la longitud de onda indicada

Cada par de ecuaciones presentados en la Tabla 6.3 permite calcular la concentración de sustrato y de producto en un tiempo de la reacción. La cinética es seguida durante 5 minutos, permitiendo así el cálculo de la pendiente ($-dS/dt$ ó dP/dt) la cual proporciona la velocidad de

la reacción. El componente utilizado para la medición de la actividades enzimáticas fue el producto. Por lo que 1 U de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μmol de producto (ácido caféico, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico) por minuto a 37°C y pH 6.

De esta manera las diferentes actividades cinamoil esterasas se midieron utilizando las longitudes de onda presentadas en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Longitudes de onda empleadas en la medición de las actividades cinamoil esterasas.

Actividad	Sustrato-producto	Longitud de onda (nm)
Cafeoil esterasa I	Ácido clorogénico	325
	Ácido caféico	285
Cafeoil esterasa II	Metil cafeato	320
	Ácido caféico	285
Feruoil esterasa	Metil ferulato	320
	Ácido ferúlico	285
<i>p</i> -Cumaroil esterasa	Metil <i>p</i> -cumarato	310
	Ácido <i>p</i> -cumárico	285

6.1.3. Sistema de reacción

Los componentes y las cantidades necesarias para llevar a cabo la reacción enzimática se indican en la Tabla 6.5. El amortiguador y el sobrenadante correspondiente fueron incubados a 37°C, la reacción fue iniciada con la adición de la cantidad de sustrato indicada. La cinética fue seguida en función del tiempo durante 5 min, a las longitudes de onda correspondientes tanto para el sustrato como para el producto de la actividad enzimática a medir (Tabla 6.4).

Para el sistema de reacción, en donde se utiliza el sobrenadante proveniente de los cultivos que contienen pulpa de café, se utiliza una menor cantidad del mismo, esto debido a que la interferencia en la absorbancia es mayor que la que proporcionan el resto de los sobrenadantes.

Tabla 6.5. Sistema de reacción para la medición de la actividad enzimática.

Componente	A	B
Amortiguador	2944 μ l	3144 μ l
Sobrenadante	300 μ l	100 μ l
Sustrato a 1.18 mM	56 μ l	56 μ l

A: Con los sobrenadantes provenientes de los medios de cultivo que contienen el trigo, el salvado de trigo, la pulpa de remolacha, el xilano de avena y el xilano de avena con adición de ácido ferúlico.

B: Con los sobrenadantes provenientes de los medios de cultivo que contienen la pulpa de café fresca y ensilada.

6.2. Selección de la cepa

Penicillium commune V33A25, *Aspergillus niger* Aa20 y *Aspergillus awamori* NRRL 3112 fueron cultivadas utilizando al xilano de avena (OSX) como inductor de la producción de cafeoil esterasa I (CAE-I), la duración de los cultivos para las tres cepas fue de 12 días.

Únicamente en el caso de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, los arabinoxilanos provenientes del OSX indujeron la producción de CAE-I, cuya actividad fue medida utilizando al ácido clorogénico como sustrato enzimático. La actividad máxima alcanzada fue de 2.13×10^{-3} U/mL. Mientras que en los sobrenadantes provenientes de los cultivos de *Penicillium commune* V33A25 y de *Aspergillus niger* Aa20, no se detectó la producción de CAE-I durante el tiempo de cultivo (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Actividad cafeoil esterasa I

Cepa	Actividad cafeoil esterasa I 10^{-3} U/mL
<i>Penicillium commune</i> V33A25	N.D.
<i>Aspergillus niger</i> Aa20	N.D.
<i>Aspergillus awamori</i> NRRL 3112	2.13

N.D. No detectada

La cinética de producción de cafeoil esterasa I por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 se presenta en la Figura 6.2. La actividad CAE-I inicia en el 4 día de cultivo, alcanzando su valor máximo en el día 8.

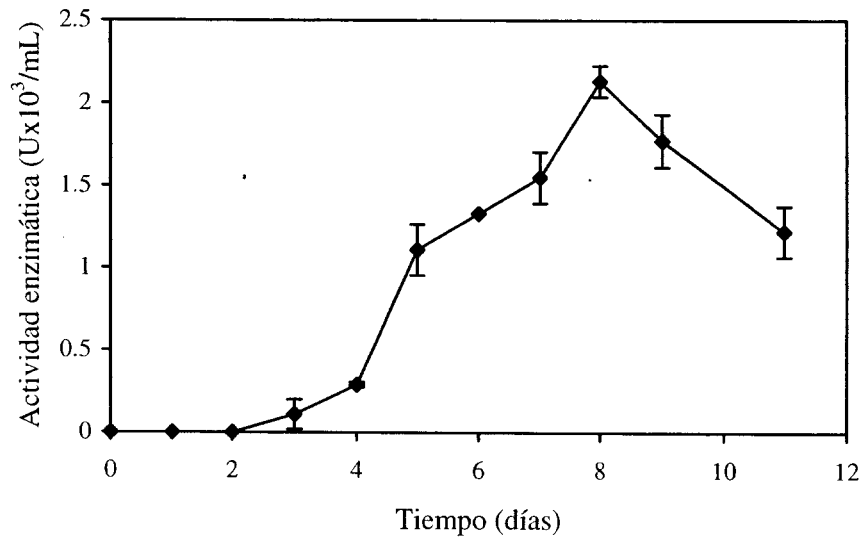


Figura 6.2. Producción de cafeoil esterasa I (♦) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de xilano de avena como inductor. La actividad fue medida utilizando al ácido clorogénico.

En la literatura no existen trabajos que reporten el uso del OSX como fuente de carbono inductora de la producción de cafeoil esterasa, empleando al ácido clorogénico como sustrato enzimático. Así mismo el ácido clorogénico ha sido escasamente utilizado en la medición de la actividad cafeoil esterasa. Recientemente Couteau *et al.* (2001) reportan el empleo de este ácido en la medición de la actividad cafeoil esterasa, utilizando el extracto enzimático obtenido a partir de bacterias aisladas del intestino humano (*Escherichia coli*, *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus gasseri*).

Por otro lado un valor semejante de actividad cafeoil esterasa al obtenido con *Aspergillus awamori* NRRL 3112 fue reportado por Faulds y Williamson (1996), con la diferencia de que en ese trabajo el sustrato enzimático utilizado fue el metil cafeato. En dicha investigación una cepa de *Aspergillus niger* fue crecida utilizando también al xilano de avena como fuente de carbono inductora. El valor de actividad máxima reportado al utilizar el metil cafeato fue de

2.6×10^{-3} U/mL sobrenadante, sin embargo, dicho valor fue alcanzado en el tercer día de cultivo, siendo la duración total del mismo de 10 días.

En cuanto a *Penicillium commune* V33A25, ésta cepa no utilizó al xilano de avena para la producción de CAE-I. Es posible que esta cepa, dado que es capaz de producir pectinasas (Roussos *et al.*, 1995), pueda producir cafeoil esterasa utilizando una fuente de carbono rica en pectinas como la pulpa de remolacha o la pulpa de café. Por lo que probablemente la inducción de la producción de cafeoil esterasa en *Penicillium commune* V33A25, este ligada al contenido de pectina y no al de arabanoxilanos presentes en el xilano de avena. Como sucede en el caso de *Aspergillus niger* CS 180, la cual utiliza la pectina de la pulpa de remolacha como inductor de la producción de cafeoil esterasa (Brézillon *et al.*, 1996).

Aspergillus niger Aa20 tampoco utilizó al xilano de avena como fuente de carbono inductora de la producción de CAE-I. Es posible, de acuerdo a lo reportado en la literatura para esta especie, que esta cepa utilice al xilano de avena como inductor de la producción de otras cinamoil esterasas como feruoil o *p*-cumaroil esterasas (Aliwan *et al.*, 1999; Vries *et al.*, 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Aspergillus awamori* NRRL 3112 fue seleccionada por su capacidad de utilizar al xilano de avena como fuente de carbono inductora de la producción de cafeoil esterasa I. Esta cepa fue utilizada en la siguiente etapa, a fin de evaluar el efecto de diferentes fuentes de carbono de tipo cereal y pulpa sobre la producción de cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterasas.

6.3. Producción de cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterasas en función de la fuente de carbono

En esta sección se presentan los resultados que se obtuvieron al utilizar tanto las fuentes de carbono inductoras de tipo cereal como las de tipo pulpa en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Las actividades cafeoil esterasa I (CAE-I), cafeoil esterasa II (CAE-II), feruoil esterasa (FAE) y *p*-cumaroil esterasa (*p*-CAE) fueron medidas en cada uno de los casos. Las figuras correspondientes a cada una de las fuentes de carbono muestran la cinética

de producción de las cinamoil esterases detectadas a lo largo del tiempo de incubación, los puntos representan la media con barras de desviación estándar de las tres replicas.

6.3.1. Fuentes de carbono tipo cereal

6.3.1.1. Xilano de avena

En la Figura 6.3 se presenta la cinética de producción de las cinamoil esterases detectadas en el sobrenadante proveniente de los cultivos en los cuales se utilizó glucosa (1% p/v) y xilano de avena (OSX, 1.5% p/v) como fuentes de carbono. Dos enzimas fueron detectadas, la cafeoil esterasa I (CAE-I, ligada al ácido clorogénico) y la feruoil esterasa (FAE). En tanto que la cafeoil esterasa II (CAE-II, ligada al metil cafeato) y *p*-cumaroil esterasa no fueron detectadas a lo largo del tiempo de cultivo.

Como puede observarse en la Figura 6.3, la actividad CAE-I aparece en el día 4 de incubación y alcanza un valor máximo en el día 8 de $2 \times 10^{-3} \text{U/mL}$ y enseguida la actividad disminuye. El comportamiento de aparición de la actividad CAE-I, así como el valor máximo obtenido coinciden con el resultado presentado en la etapa de selección de la cepa (Figura 6.2).

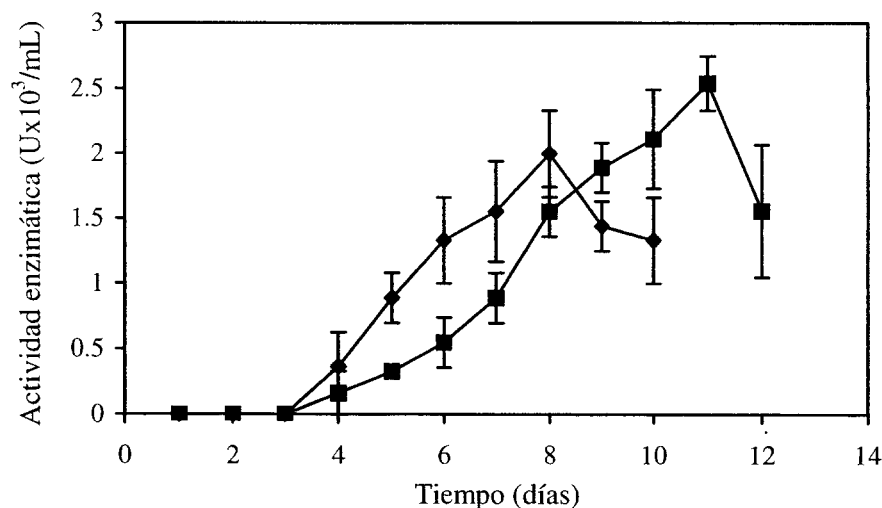


Figura 6.3. Producción de cafeoil esterasa I (♦) y feruoil esterasa (■) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de xilano de avena como fuente de inductores. Las actividades fueron medidas utilizando los siguientes sustratos: ácido clorogénico y metil ferulato.

En cuanto a la actividad feruol esterasa (FAE), ésta aparece también al 4 día y su valor máximo es alcanzado al día 11 (2.5×10^{-3} U/mL). Este valor es comparable a lo reportado por Faulds y Williamson (1996), en ese trabajo al utilizar OXS (1% p/v) y glucosa (0.1% p/v) en el medio de cultivo de *Aspergillus niger* (cultivos incubados a 25°C), se reporta un valor de actividad máxima FAE de 4.2×10^{-3} U/mL, medida también con el metil ferulato. Sin embargo, este valor fue alcanzado en un tiempo más corto (día 4 de cultivo) que con *Aspergillus awamori* NRRL 3112 (día 11).

Es posible que el tiempo máximo de actividad FAE en *Aspergillus awamori*, se haya retrasado en comparación a lo obtenido por Faulds y Williamson (1996), debido a la represión catabólica provocada por la cantidad de glucosa agregada al medio, que en el caso de *Aspergillus awamori* fue de 1% p/v, mientras que en el trabajo antes citado utilizaron 0.1% p/v. La mayor concentración de glucosa pudo haber retrasado la inducción de la producción de la feruol esterasa. Sin embargo, existen reportes en donde al utilizar una concentración de glucosa de 0.1% p/v y de pulpa de remolacha azucarera (1% p/v) las actividades detectadas, en este caso cafeoil y *p*-cumaroil esterases aparecen en el día 4 de cultivo.

Así mismo, las cinamoil esterases producidas al utilizar el xilano de avena en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori*, coinciden con lo reportado en otras investigaciones. Faulds y Williamson (1991) reportan al xilano de avena como inductor de la producción de feruol esterasa al ser utilizado en el medio de cultivo de *Streptomyces olivochromogenes* NRCC 2258. En 1994, Faulds y Williamson reportan al xilano de avena como inductor de la producción de feruol y sinapil esterases, al ser utilizado en el medio de cultivo de *Aspergillus niger* CBS 120.49, en ese mismo trabajo tanto la cafeoil esterasa II como la *p*-cumaroil esterasa son producidas en bajos niveles. De acuerdo a lo anterior es posible que el xilano de avena no sea una fuente de inductores para la producción de cafeoil y *p*-cumaroil esterases, lo cual coincide con la ausencia de la producción de estas dos enzimas en el caso de *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

En la literatura no hay antecedentes acerca del uso del xilano de avena en cultivos de cepas de *Aspergillus awamori*. Sin embargo, existe un reporte en donde la paja de avena es utilizada en

el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* IMI 142717. En dicho trabajo (McCrae *et al.*, 1994) reportan la producción de feruoil y *p*-cumaroil esterasas, sin embargo, las condiciones de cultivo (fermentador de 12 L) son distintas.

La producción de feruoil esterasa y cafeoil esterasa I, así como la ausencia de la *p*-cumaroil esterasa, al utilizar el xilano de avena en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, podría estar ligada con el hecho de que aunque no se ha detectado la presencia de los ácidos ferúlico y caféico en el xilano de avena (Faulds y Williamson, 1996), estos compuestos si se encuentran en la pared celular de la avena, ambos representan entre el 0.01 y el 0.016% p/p. En tanto que el ácido *p*-cumárico, se encuentra en cantidades menores (0.003% p/p) en los cereales (Auerbach y Gray, 1999; Clifford, 1999; Kroon *et al.*, 1999).

Por otro lado, el haber detectado la actividad CAE-I y la ausencia de la actividad CAE-II, indica que la enzima producida presenta afinidad por el enlace éster existente entre los ácidos caféico y quínico, mientras que no presenta afinidad por el enlace éster entre el ácido caféico y el grupo metilo (metil cafeato). Esto es indicador de la forma en que el ácido caféico puede encontrarse en la avena, es decir en forma de ácido clorogénico.

6.3.1.2. Xilano de avena con adición de ácido ferúlico

Se estudió el efecto de la adición de ácido ferúlico (AF, 0.03% p/v) en presencia de glucosa (1% p/v) y xilano de avena (OSX, 1.5% p/v) en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, sobre los niveles de producción de las 4 cinamoil esterasas buscadas. La Figura 6.4 presenta la cinética de producción de las cinamoil esterasas detectadas en el sobrenadante. Éstas son la cafeoil esterasa I y la feruoil esterasa, mismas que fueron detectadas en ausencia de ácido ferúlico, pero a niveles menores (Figura 6.3). Las enzimas CAE-II y *p*-CAE no fueron detectadas en los cultivos.

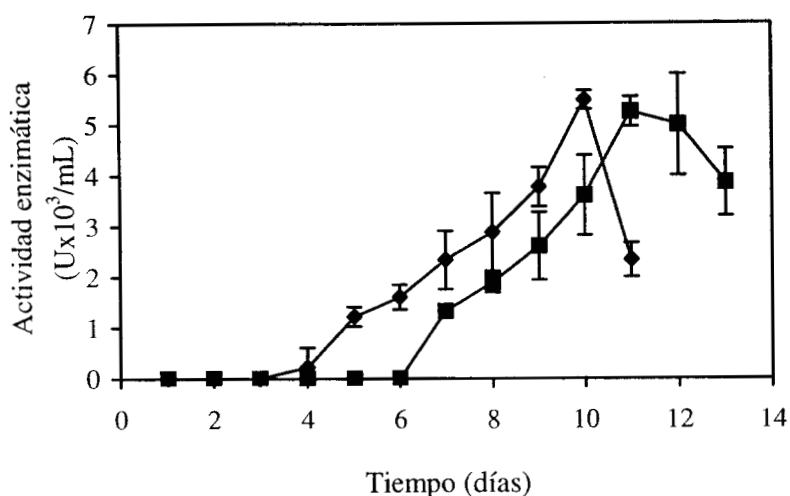


Figura 6.4. Producción de cafeoil esterasa I (◆) y feruoil esterasa (■) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de xilano de avena y 0.03% p/v de ácido ferúlico como fuentes de inductores. Las actividades fueron medidas utilizando los siguientes sustratos: ácido clorogénico y metil ferulato.

La cinética de producción de la CAE-I (Figura 6.4) presenta un comportamiento similar al que se obtuvo utilizando OSX y glucosa en el medio de cultivo, pero sin adición de ácido ferúlico (Figura 6.3). No obstante, el valor máximo es mayor al doble (5.5 en lugar de $2 \times 10^{-3} \text{U/mL}$) alcanzado en el día 10 de cultivo en lugar del día 8.

Un comportamiento similar fue observado en la producción de la FAE, ya que el valor máximo fue también el doble (5.3 en lugar de $2.5 \times 10^{-3} \text{U/mL}$), pero esta vez sin cambio en el tiempo de actividad máxima, alcanzado en el día 11. Por lo que la adición de ácido ferúlico en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori*, permitió duplicar los niveles máximos de actividad FAE y CAE-I.

Las tendencias en el comportamiento de las actividades CAE-I y FAE al utilizar el OSX con y sin adición de ácido ferúlico en el medio (Figuras 6.4 y 6.3), sugieren que el xilano de avena indujo la producción de una enzima, la cual tiene actividad sobre el ácido clorogénico y sobre el metil ferulato y no presenta actividad sobre los ésteres metilados de los ácidos caféico y *p*-cumárico. Estos comportamientos sugieren así mismo que la presencia ácido ferúlico en el medio mostró un efecto de regulación positiva en la producción de tal enzima.

Por otro lado, el aumento de la actividad FAE observado con la adición de ácido ferúlico, coincide con lo reportado por Faulds y Williamson (1999), en dicha investigación, *Aspergillus niger* CBS 120.49 es cultivado utilizando OSX (1% p/v) y glucosa (0.1% p/v) como fuentes de carbono y con adición de la misma concentración de ácido ferúlico (0.03% p/v). La adición de ácido ferúlico incrementó 1.2 veces la actividad FAE medida con el metil ferulato, utilizando igualmente al cultivo con OSX y glucosa como referencia.

El aumento en la actividad FAE al adicionar el ácido ferúlico, podría estar relacionado con la ruta metabólica de degradación que sigue el ácido ferúlico, el cual se ha comprobado que es consumido del medio, en las primeras 24 horas de cultivo de *Aspergillus niger* (Faulds *et al.*, 1997). El ácido ferúlico es transformado a ácido vainílico, el cual puede sufrir una desmetilación pasando a ácido protocatéquico o bien una descarboxilación pasando a metoxihidroquinona. Dado que el ácido caféico y el ácido benzoico (moléculas que no poseen un grupo metoxilo) no aumentan la producción de FAE si no contrariamente la disminuyen (Faulds y Williamson, 1999), por lo tanto se considera que el proceso involucra una descarboxilación, la cual permite conservar el grupo metoxilo del anillo aromático del ácido vainílico, provocando un efecto de regulación positiva en la producción de FAE.

6.3.1.3. Trigo sin salvado

En la Figura 6.5 se muestra la cinética de producción de la única cinamoil esterasa detectada al utilizar glucosa (1% p/v) y trigo sin salvado (1.5% p/v) como fuentes de carbono en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori*. La cinamoil esterasa detectada fue la CAE-I, mientras que las enzimas CAE-II, FAE y *p*-CAE no fueron detectadas. La actividad CAE-I inicia en el día 3 del cultivo y alcanza un valor máximo en el día 6 de $19.3 \times 10^{-3} \text{U/mL}$. Este valor es 3.5 veces mayor al valor máximo determinado con la combinación xilano de avena y ácido ferúlico (Figura 6.4) de $5.5 \times 10^{-3} \text{U/mL}$ y 10 veces superior al valor máximo observado sin la adición de ácido ferúlico (Figura 6.3).

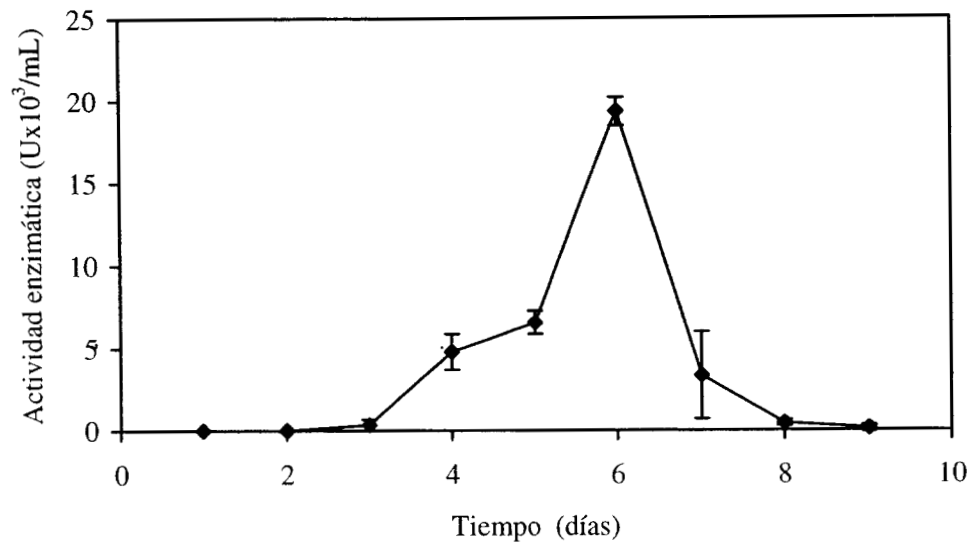


Figura 6.5. Producción de cafeoil esterasa I (♦) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de trigo como fuente de inductores. La actividad fue medida utilizando al ácido clorogénico.

La producción de CAE-I puede explicarse de la siguiente manera. Dado que el trigo utilizado es un producto comercial (trigo precocido), podría ser que el ácido ferúlico presente en este trigo, sufra durante alguna etapa de su procesamiento o bien durante el cultivo una desmetilación, convirtiéndose en su hidroxilado homólogo, el ácido caféico (ácido 3,4-dihidroxicinámico), lo cual podría ser un factor positivo en la inducción de la producción de CAE-I (Figuroa-Espinoza *et al.*, 1999).

Por otro lado el no haber detectado la actividad CAE-II es un indicador de que *Aspergillus awamori* NRRL 3112 presenta una tendencia a la producción de CAE-I con esta fuente de inductores.

La producción de FAE, *p*-CAE, CAE-II y en particular de la FAE se encuentra relacionada con el contenido en arabinosilanos y en ácido ferúlico (Faulds y Williamson, 1999), los cuales están presentes en mayor cantidad en el salvado que en el grano de los cereales (Saulnier *et al.*, 2000).

Esto explica el hecho de que las actividades FAE, *p*-CAE y CAE-II no hayan sido detectadas en el sobrenadante proveniente del medio de cultivo de *Aspergillus awamori*, al utilizar trigo sin salvado.

6.3.1.4. Salvado de trigo

La Figura 6.6 muestra la cinética de producción de las cinamoil esterases detectadas en el sobrenadante proveniente de los cultivos en los que se utilizó glucosa y salvado de trigo como fuentes de carbono para el crecimiento de *Aspergillus awamori*. Estas fueron la CAE-I, CAE-II y *p*-CAE, la producción de FAE no fue detectada.

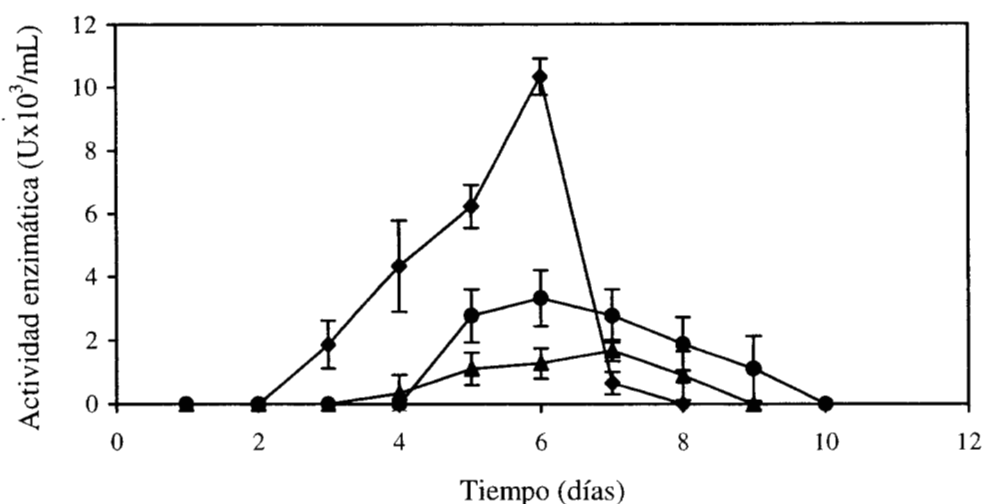


Figura 6.6. Producción de cafeoil esterasa I (◆), cafeoil esterasa II (■) y *p*-cumaroil esterasa (●) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de salvado de trigo como fuente de inductores. Las actividades fueron medidas utilizando los siguientes sustratos: ácido clorogénico, metil cafeato y metil *p*-cumarato respectivamente.

La principal actividad fue la CAE-I, la cual aparece en el día 3 de incubación y alcanza su valor máximo en el día 6 ($10.3 \times 10^3 \text{ U/mL}$). En cuanto a la actividad *p*-CAE, esta aparece en el día 5 y alcanza igualmente su valor máximo en el día 6 ($3.3 \times 10^3 \text{ U/mL}$).

Finalmente, la actividad CAE-II inicia en el día 4 de cultivo y alcanza su valor máximo al día 7 ($1.7 \times 10^3 \text{ U/mL}$).

Los resultados obtenidos al utilizar el salvado de trigo como fuente de carbono en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, presentan diferencias y similitudes con lo reportado previamente en la literatura. Una diferencia importante es la ausencia de la producción de FAE por *Aspergillus awamori*. En tanto que en el sobrenadante proveniente de los cultivos de *Aspergillus niger*, Faulds y Williamson (1996) reportan la producción de la FAE (10.5×10^{-3} U/mL), al utilizar 1% p/v de salvado de trigo libre de almidón y un suplemento de 0.1% p/v de glucosa en el medio de cultivo. En cambio, los niveles y tendencias de las actividades CAE-II y *p*-CAE determinadas en el sobrenadante de los cultivos de *Aspergillus awamori*, coinciden a los reportados en el caso de *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1996). En el caso de *Aspergillus niger* la actividad CAE-II alcanza un valor de 3.2×10^{-3} U/mL en el día 7 de cultivo y la actividad *p*-cumaroil esterasa de 3.0×10^{-3} U/mL en el día 6.

Por otro lado, la ausencia de las actividades CAE-II y *p*-CAE al utilizar el trigo sin salvado (Figura 6.5) y la determinación de estas dos actividades al utilizar el salvado de trigo (Figura 6.6), confirman que el salvado de trigo es fuente de inductores de la producción de CAE-II y *p*-CAE, al ser utilizados en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Lo cual de acuerdo a investigaciones previas, se encuentra relacionado con el mayor contenido en arabinosilanos presentes en el salvado de trigo.

De acuerdo al perfil de las cinéticas de producción de CAE-II y *p*-CAE (Figura 6.6), es probable que el salvado de trigo haya inducido la producción de dos enzimas, una con afinidad a fin al ácido clorogénico y otra que tenga afinidad por los metil ésteres de los ácidos caféico y *p*-cumárico. Esta afinidad puede deberse a la similitud en la estructura de los ácidos caféico y *p*-cumárico, la cual consiste en la presencia de grupos hidroxilos sustituidos en el anillo aromático de estos ácidos. Esta afinidad ha sido observada también en *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson 1996) y en *Aspergillus niger* CS 180 (Kroon *et al.*, 1996), en dichos trabajos la afinidad CAE-II/*p*-CAE, así como FAE/SAE (sinapil ácido esterasa) son observadas. En el caso de la FAE y la SAE, la afinidad esta relacionada con la presencia de grupos metoxilicos en los ácidos ferúlico y sinápico.

Los resultados indican, que el salvado de trigo, subproducto con un alto contenido en arabinoxilanos induce en *Aspergillus awamori* la producción de una o más enzimas afines a cinamatos hidroxilados como el ácido caféico y el *p*-cumárico y no induce la producción de alguna enzima a fin a un cinamato metoxilado como el ácido ferúlico. Otro factor indicador de que *Aspergillus awamori* no induce la producción de la FAE, al encontrarse presente en el medio el salvado de trigo, es el hecho de que este subproducto contiene 1% p/p de ácido ferúlico (Faulds y Williamson, 1996), el cual hubiera actuado como un factor positivo en el caso de que la enzima feruoil esterasa se hubiera producido (Faulds y Williamson, 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos al utilizar compuestos de tipo cereal (xilano de avena, xilano de avena-ácido ferúlico, trigo y salvado de trigo) como fuentes de inductores de la producción de las cinamoil esterases por *Aspergillus awamori*, se tiene lo siguiente:

El xilano de avena, el cual está constituido de arabinoxilanos, induce la producción de cafeoil esterasa I y feruoil esterasa. Al parecer el xilano de avena es fuente de inductores de una enzima, la cual tiene especificidad por el ácido clorogénico y por el metil ferulato. Esto se basa en el hecho de que la adición de ácido ferúlico (0.03% p/v) al medio, estimula los niveles de las actividades cafeoil I y feruoil esterases, lo cual estaría en relación con un aumento en la producción de la enzima. Así mismo el xilano de avena no es fuente de inductores de producción de cafeoil II y *p*-cumaroil esterases. Los resultados indican, que ni el trigo sin salvado ni el salvado de trigo son fuentes de inductores de la producción de FAE por *Aspergillus awamori*. Sin embargo, el salvado de trigo es una fuente de inductores de la producción de CAE-I, *p*-CAE y CAE-II.

Por otro lado, el trigo sin salvado comparado con el salvado de trigo y la combinación xilano de avena-ácido ferúlico, es la mejor fuente de inductores de la producción de CAE-I por *Aspergillus awamori*, proporcionando niveles de actividad semejantes a lo reportado en otras enzimas de este tipo, bajo condiciones de cultivo similares. Así por ejemplo en el sobrenadante proveniente de los cultivos de *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1996) en los que se utilizó salvado de trigo (1% p/v), la máxima actividad feruoil esterasa alcanzada fue de $10.5 \times 10^{-3} \text{U/mL}$ y para la actividad sinapil esterasa se alcanzó un valor de $33.5 \times 10^{-3} \text{U/mL}$.

6.3.2. Fuentes de carbono tipo pulpa

6.3.2.1. Pulpa de remolacha azucarera

La Figura 6.7 muestra la cinética de producción de las cinamoil esterases obtenidas al utilizar glucosa (1% p/v) y pulpa de remolacha azucarera (1.5% p/v) como fuentes de carbono para el crecimiento de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Como puede observarse las 4 cinamoil esterases buscadas (CAE-I, CAE-II, FAE y *p*-CAE) fueron detectadas. La principal actividad cuantificada fue la CAE-I.

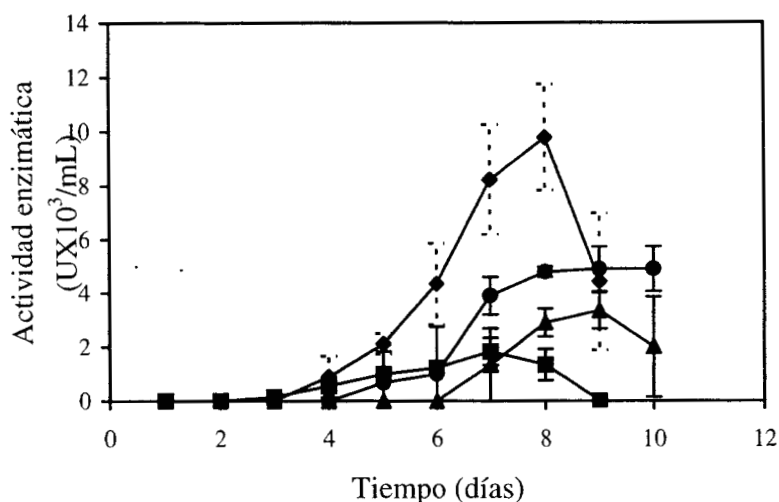


Figura 6.7. Producción de cafeoil esterasa I (◆), cafeoil esterasa II (▲), feruoil esterasa (■) y *p*-cumaroil esterasa (●) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de pulpa de remolacha como fuente de inductores. Las actividades fueron medidas utilizando los siguientes sustratos: ácido clorogénico, metil cafeato, metil ferulato y metil *p*-cumarato respectivamente.

A diferencia del salvado de trigo, el cual permite la producción de CAE-I, CAE-II y *p*-CAE, la pulpa de remolacha azucarera es fuente de inductores para la producción de estas tres cinamoil esterases y además de la FAE. En cuanto a los niveles de actividad CAE-I, *p*-CAE y CAE-II, estos son similares a los obtenidos con el salvado de trigo (Figura 6.6). En cambio la actividad FAE obtenida al utilizar la pulpa de remolacha, presenta niveles similares a los obtenidos con el xilano de avena (Figura 6.3).

De acuerdo a la literatura las pectinas, principales polisacáridos de la pulpa de remolacha (25% p/p), son la fuente de carbono inductora, principalmente de dos cinamoil esterases por *Aspergillus niger* CS 180 (Brézillon *et al.*, 1996). Éstas son la cafeoil esterasa, medida con el metil cafeato y la *p*-CAE, medida con el metil *p*-cumarato. Así mismo, tanto la FAE como la SAE son también detectadas en el sobrenadante proveniente de los cultivos de *Aspergillus niger* CS 180, pero en niveles 10 veces más bajos. Cabe señalar que *Aspergillus niger* CS 180 es una de las cepas más estudiadas, al utilizar la pulpa de remolacha en el medio de cultivo (Saulnier y Thibault, 1999; Kroon y Williamson, 1996; Brézillon *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos al utilizar la pulpa de remolacha en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* concuerda con los reportados por Brézillon *et al.* (1996), en cuanto a la afinidad por el sustrato de las enzimas producidas. En el caso de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, las enzimas CAE-I, *p*-CAE y CAE-II permiten la liberación de ácidos, cuyas estructuras poseen grupos hidroxilos únicamente en el anillo aromático como son, el ácido caféico y el ácido *p*-cumárico. En *Aspergillus niger* CS 180 se reporta la producción de CAE-II y *p*-CAE, las cuales liberan los mismo ácidos. Sin embargo los niveles de actividad CAE-II y *p*-CAE son 7 y 5 veces mayores respectivamente, cuando se utiliza la pulpa de remolacha en el medio de cultivo de *Aspergillus niger* que al utilizarla en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori*.

En cuanto a la FAE, también se presenta una similitud tanto en *Aspergillus awamori* como en *Aspergillus niger* CS 180. Ambas cepas al crecer en presencia de polisacáridos complejos como las pectinas presentes en la pulpa de remolacha inducen en bajos niveles la producción de una enzima a fin a un ácido hidroxicinámico cuyo anillo aromático se encuentra sustituido con un grupo metoxilo como es el caso del ácido ferúlico. En el caso de la FAE de *Aspergillus awamori*, la actividad aparece en el día 4 de cultivo y se incrementa ligeramente hasta alcanzar su valor máximo en el día 7 (1.8×10^{-3} U/mL), mientras que con *Aspergillus niger* CS180, la actividad aparece en el día 3 y se mantiene en bajos niveles (1×10^{-3} U/mL) hasta su desaparición en el día 10.

Por el comportamiento en las cinéticas de producción de CAE-I, CAE-II, FAE y *p*-CAE obtenidas al utilizar la pulpa de remolacha (Figura 6.7) y por la explicación dada con relación

a la afinidad de las enzimas por un determinado ácido hidroxicinámico, se puede suponer que la pulpa de remolacha al ser utilizada en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, induce la producción de tres enzimas del tipo cinamoil esterasa, una que es a fin al ácido clorogénico, otra a fin al metil cafeato y al metil *p*-cumarato y una tercera a fin al metil ferulato.

6.3.2.2. Pulpa de café fresca

La Figura 6.8 presenta la cinética de producción de CAE-I, la cual fue la única cinamoil esterasa detectada, al utilizar como fuentes de carbono glucosa (1% p/v) y pulpa de café fresca y liofilizada (1.5% p/v) en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Las enzimas FAE, CAE-II y *p*-CAE no fueron detectadas.

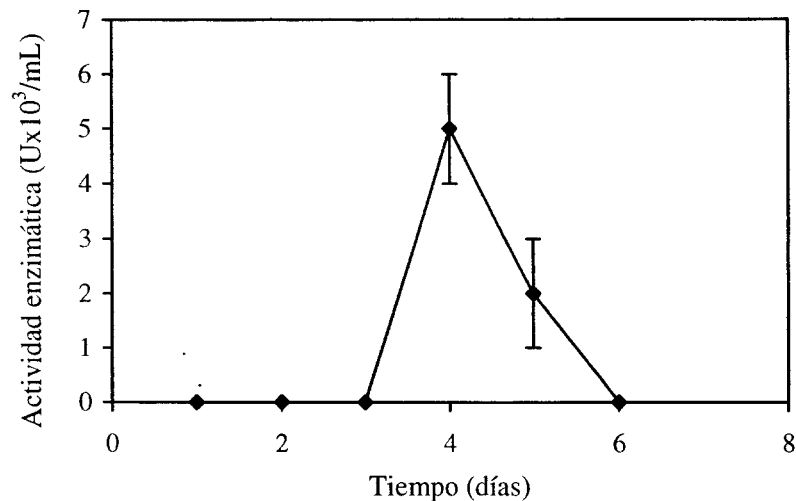


Figura 6.8. Producción de cafeoil esterasa I (♦) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de pulpa de café fresca y liofilizada como fuente de inductores. La actividad fue medida utilizando al ácido clorogénico.

El perfil de actividad CAE-I obtenido al utilizar la pulpa de café fresca, presenta una tendencia diferente a la que se obtiene con los sustratos de tipo cereal y con la pulpa de remolacha (Figuras 6.3, 6.4, 6.5, 6.6 y 6.7). En los cultivos anteriores se observa un aumento gradual en la actividad CAE-I, durante el tiempo de cultivo hasta alcanzar el valor máximo. En cambio al utilizar la pulpa de café, la actividad CAE-I aparece y aumenta bruscamente como se puede

observar en la Figura 6.8, alcanzando su valor máximo en sólo 24 h (5×10^{-3} U/mL) y enseguida la actividad disminuye.

La pulpa de café fresca contiene principalmente dos polímeros estructurales, la celulosa (17.7% p/p del material) y la lignina (17.5% p/p del material). La lignina es un polímero fenólico que hasta la fecha no ha sido estudiado en la inducción de la producción de las cinamóil esterasas. Por otro lado, la celulosa ha mostrado ser fuente de inductores de las enzimas FAE y *p*-CAE, al ser utilizada en el medio de cultivo de *Neocallimastix* MC-2 (Borneman *et al.*, 1992). Dado que la pulpa de café contiene una elevada cantidad de celulosa, se podría esperar que actuara como fuente de carbono inductora de las enzimas FAE y *p*-CAE en *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Sin embargo, ambas actividades no fueron detectadas.

La producción de CAE-I y la ausencia de CAE-II, FAE y *p*-CAE, al utilizar la pulpa de café fresca en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, puede también explicarse en el hecho de que la pulpa de café es un subproducto que contiene una elevada cantidad de ácido clorogénico (0.36-2.7% peso seco) y ácido caféico (0.31-1.6% peso seco). De acuerdo a los resultados obtenidos al adicionar ácido ferúlico al medio de cultivo (Figura 6.4) y de acuerdo a lo reportado por Faulds y Williamson (1999), la presencia de ácido ferúlico en el medio estimula la actividad FAE, por lo que de una manera similar la presencia de ácido clorogénico y de ácido caféico en el medio estimularía la actividad CAE-I. Así mismo Faulds y Williamson (1999), reportan que la presencia de ácido caféico a una concentración de 0.03% p/v en el medio de cultivo, reduce la actividad FAE en un 50%, lo cual puede explicar la ausencia de esta actividad en el caso de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Las actividades CAE-II y *p*-CAE, podrían presentar una inhibición semejante debido a la presencia de los ácidos caféico y clorogénico.

Por otro lado, la pulpa de café contiene una baja cantidad en pectinas (6.5% p/p) comparada con la pulpa de remolacha (25% p/p) y en hemicelulosas (2.3% p/p) con relación al salvado de trigo (26% p/p). Estas bajas cantidades son indicadoras de que posiblemente la cantidad de pectinas de la pulpa de café no es una fuente potencial de inductores de la CAE-II, como sucede en el caso de la pulpa de remolacha (Figura 6.7) y según lo reportado por Brézillon *et*

al. (1996). Y lo mismo en el caso de la cantidad de hemicelulosas en la pulpa de café, las cuales quizás no sean suficientes en la inducción de CAE-II y *p*-CAE, como sucede con el salvado de trigo (Figura 6.6) o en el caso de la FAE y la *p*-CAE inducidas también con el salvado de trigo por *Penicillium pinophilum* (Castanares *et al.*, 1992).

En cuanto a la CAE-I, es posible que la lignina o bien la celulosa, los cuales son los polímeros mayoritarios de la pulpa de café sean los responsables de su inducción.

6.3.2.3. Pulpa de café ensilada

En esta sección se presentan primeramente los resultados obtenidos al utilizar la pulpa de café ensilada a una concentración de 1.5% p/v y enseguida los obtenidos a una concentración de 0.5% p/v en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Una menor concentración en pulpa fue utilizada considerando que los productos de fermentación del ensilaje como los ácidos láctico y acético, podrían ser tóxicos para el crecimiento de la cepa y en consecuencia disminuir la producción de las enzimas cinamoil estererasas.

La Figura 6.9 muestra la cinética de producción de las cinamoil estererasas detectadas al utilizar glucosa (1% p/v) y pulpa de café ensilada y liofilizada (1.5% p/v) como fuentes de carbono en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. La principal actividad detectada fue la CAE-I, la cual alcanza un valor máximo de $20 \times 10^{-3} \text{U/mL}$. Así mismo la actividad *p*-CAE fue detectada pero en menor grado, su valor máximo alcanzado fue de $2.7 \times 10^{-3} \text{U/mL}$ en el día 5. Las actividades FAE y CAE-II no fueron detectadas.

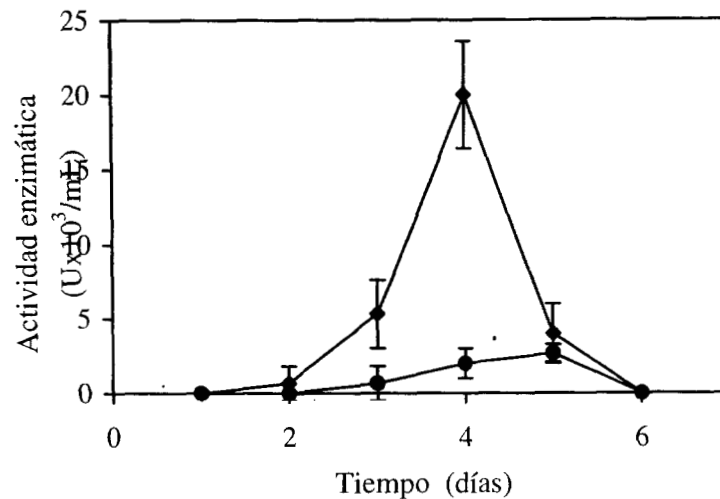


Figura 6.9. Producción de cafeoil esterasa I (♦) y *p*-cumaroil esterasa (●) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 1.5% p/v de pulpa de café ensilada y liofilizada como fuente de inductores. Las actividades fueron medidas utilizando los siguientes sustratos: ácido clorogénico y metil *p*-cumarato.

El perfil de la actividad CAE-I, presenta un comportamiento idéntico en los tiempos de aparición y de actividad máxima, al que se obtuvo al utilizar la pulpa de café fresca (Figura 6.8), pero en el caso de la pulpa de café ensilada, el valor de actividad CAE-I es 4 veces superior al obtenido con la pulpa de café fresca.

Los resultados obtenidos, pueden explicarse al considerar las características de la pulpa de café ensilada. El proceso de fermentación anaerobio por bacterias lácticas (ensilaje), al cual es sometida la pulpa de café, ocasiona un aumento en la cantidad de celulosa y de lignina. Así mientras que la pulpa de café fresca presenta 17.7 y 17.5% p/p del material en celulosa y lignina respectivamente, la pulpa de café ensilada presenta 27.2 y 21.2% p/p del material, de los mismo polímeros (Bressani y Braham, 1980). Este incremento en ambos polímeros podría explicar el aumento en la inducción de la CAE-I, la cual aparece tanto al utilizar la pulpa de café fresca (Figura 6.8), como la pulpa de café ensilada. Así mismo esto podría también ser un factor positivo para la producción de la *p*-CAE, cuya inducción esta relacionada con la celulosa (Borneman *et al.*, 1991; Borneman *et al.*, 1992).

Por otro lado, ciertas especies de bacterias lácticas aisladas del intestino humano, tales como *Bifidobacterium lactis* y *Lactobacillus gasseri*, han sido recientemente reportadas (Couteau *et al.*, 2001) con la capacidad de utilizar al ácido clorogénico del medio de cultivo, como un factor positivo en la inducción de la producción de CAE-I, FAE y *p*-CAE. Esto nos indica que probablemente las bacterias lácticas durante el ensilaje de la pulpa de café produjeron la CAE-I, la cual también durante el proceso del ensilaje liberó ácido caféico, incrementando aún más los niveles de este compuesto fenólico simple en la pulpa de café, incrementando así un factor positivo en la inducción de la CAE-I, lo cual se ve reflejado en el aumento de esta actividad al utilizar la pulpa de café ensilada. Así mismo un aumento en ácido caféico, representa un factor de inhibición de la FAE (Faulds y Williamson, 1999).

Otra información interesante que muestra este experimento es que los productos del metabolismo presentes en la pulpa de café ensilada, como son el ácido láctico y acético no perturbaron el crecimiento de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, cuando ésta es utilizada a una concentración de 1.5% p/v en el medio de cultivo. Si no que contrariamente la pulpa de café ensilada a dicha concentración permite aumentar los niveles de actividad CAE-I con respecto a la pulpa de café fresca.

En seguida se presentan los resultados obtenidos al utilizar como fuente de carbono glucosa (1% p/v) y una concentración 3 veces menor al experimento anterior en pulpa de café ensilada y liofilizada (0.5% p/v) en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

La Figura 6.10 muestra la cinética de producción de la CAE-I, la cual fue la única cinamoil esterasa detectada en el sobrenadante. Las enzimas FAE, CAE-II y *p*-CAE no fueron detectadas en ninguno de los cultivos.

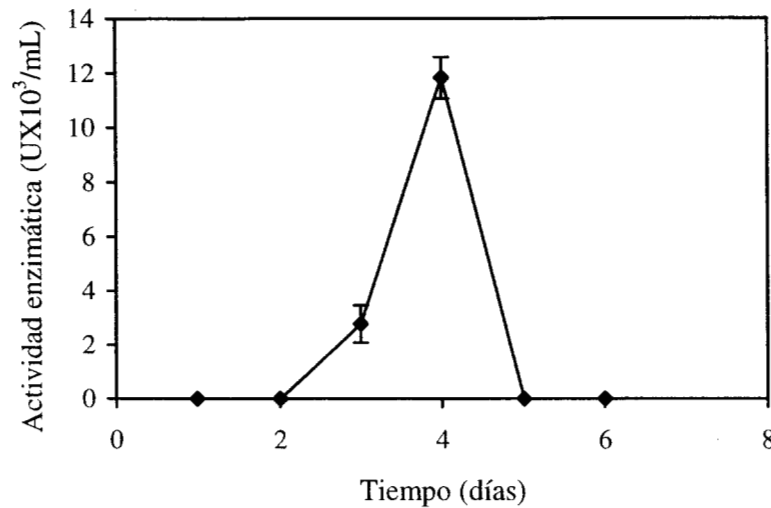


Figura 6.10. Producción de cafeoil esterasa I (♦) por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, utilizando 0.5% p/v de pulpa de café ensilada y liofilizada como fuente de inductores. Las actividad fue medida utilizando al ácido clorogénico.

Contrariamente al experimento efectuado con una concentración de pulpa de café ensilada de 1.5% p/v, el empleo de una concentración de la misma pulpa a 0.5% p/v, no permitió detectar la actividad *p*-CAE.

El comportamiento de la actividad CAE-I, al utilizar la pulpa de café ensilada a una concentración de 0.5% p/v, presenta nuevamente el mismo aumento brusco y disminución en la actividad CAE-I (Figura 6.10), al observado con la pulpa de café fresca (Figura 6.8) y con la pulpa de café ensilada a una concentración de 1.5% p/v (Figura 6.9). Sin embargo, el valor de actividad máxima alcanzado con la pulpa de café ensilada a 0.5% p/v ($11.8 \times 10^{-3} \text{U/mL}$) es mayor al doble del alcanzado con la pulpa de café fresca ($5 \times 10^{-3} \text{U/mL}$), pero menor al valor que se obtuvo con la pulpa de café ensilada a 1.5% p/v ($20 \times 10^{-3} \text{U/mL}$).

De esta manera se comprueba que los niveles de producción de CAE-I al utilizar la pulpa de café ensilada (0.5% p/v) se duplican en relación a los niveles obtenidos al utilizar la pulpa de café fresca a 1.5% p/v. Así mismo los niveles de producción son cuatro veces superiores al utilizar la pulpa de café ensilada a una concentración de 1.5% p/v con relación a la pulpa de

café fresca a la misma concentración. EL aumento en la producción de CAE-I al utilizar la pulpa de café ensilada puede deberse, como ya se explicó anteriormente, al aumento en la cantidad de celulosa y lignina o por una posible acción enzimática cinamoil esterasa, en especial CAE-I producida por las bacterias lácticas sobre la pulpa de café durante el proceso de ensilaje.

Los experimentos realizados con pulpa de café ya sea fresca o ensilada confirman que la FAE no es inducida al utilizar este sustrato como fuente de carbono en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, lo cual puede deberse a la presencia del ácido caféico libre en la pulpa de café, ya que de acuerdo a lo reportado por Faulds y Williamson (1999), el ácido caféico a una concentración de 0.03% en el medio de cultivo de *Aspergillus niger* inhibe en un 50% la actividad feruoil esterasa.

Los resultados obtenidos al utilizar sustratos tipo pulpa (pulpa de remolacha y pulpa de café fresca y ensilada) como fuentes de carbono en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, presentan diferencias importantes. La pulpa de remolacha muestra mayor diversidad en la inducción de enzimas del tipo cinamoil esterasas, con respecto a la pulpa de café ya sea fresca o ensilada a 0.5 y 1.5% p/v. Sin embargo, la pulpa de café ensilada a 0.5 y 1.5% p/v, presentan la ventaja de alcanzar el nivel máximo de actividad CAE-I en un tiempo más corto sobre la pulpa de remolacha. La pulpa de café fresca a pesar de que alcanza el nivel máximo de actividad igual que la pulpa de café ensilada a ambas concentraciones, presenta el nivel más bajo de actividad CAE-I comparado con la pulpa de remolacha y con la pulpa de café ensilada.

6.2.3. Síntesis de resultados y análisis estadístico

En esta sección se presenta una síntesis de los resultados obtenidos al utilizar diferentes fuentes de carbono de tipo cereal y tipo pulpa en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 en la producción de CAE-I, CAE-II, FAE y *p*-CAE. Así mismo un análisis estadístico fue efectuado para cada una de las 4 actividades cinamoil esterasas estudiadas, a fin de determinar si existe diferencia significativa entre las fuentes de carbono empleadas. En esta sección se presentan también los valores de productividad calculados en los tiempos máximos de actividad para cada una de las fuentes de carbono utilizadas.

Los resultados muestran que todas las fuentes de inductores probadas, tanto de tipo cereal (xilano de avena, xilano de avena-ácido ferúlico, trigo sin salvado y salvado de trigo) como de tipo pulpa (pulpa de remolacha, pulpa de café fresca y pulpa de café ensilada) inducen la producción de la cafeoil esterasa I (CAE-I).

En la Figura 6.11 se presentan los valores máximos que se obtuvieron para la actividad CAE-I (sustrato: ácido clorogénico), con las diferentes fuentes de carbono probadas en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Como puede observarse tres fuentes de carbono tipo pulpa (pulpa de café ensilada a 1.5 y 0.5% p/v y pulpa de remolacha) y dos fuentes de tipo cereal (trigo sin salvado y salvado de trigo), fueron las fuentes que proporcionaron los valores más elevados de la actividad CAE-I.

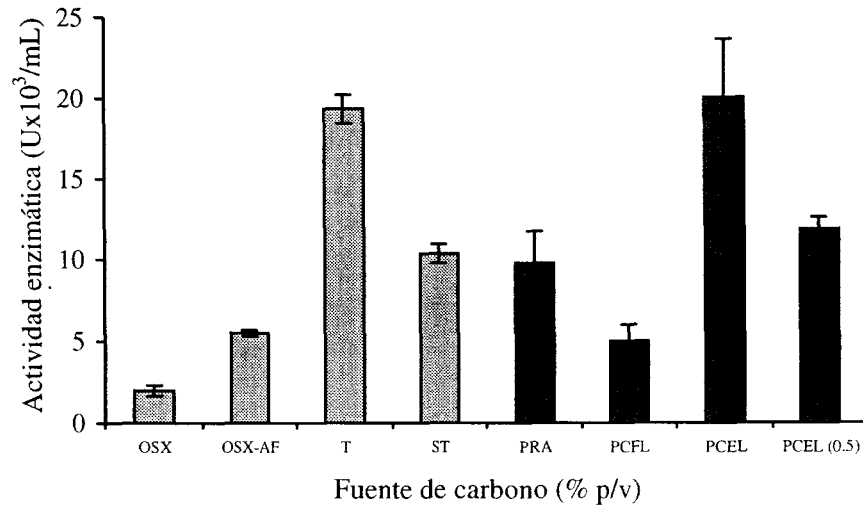


Figura 6.11. Valores máximos de la actividad extracelular cafeoil esterasa I (CAE-I) obtenidos al utilizar diferentes fuentes de inductores en el medio de cultivo *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Una concentración de 1.5% p/v fue utilizada en todos los casos, excepto con la pulpa de café ensilada y liofilizada donde la concentración de 0.5% p/v fue también probada. El ácido ferúlico es utilizado a 0.03% p/v en presencia de xilano de avena.

OSX = xilano de avena; OSX-AF = xilano de avena-ácido ferúlico; T = trigo sin salvado; ST = salvado de trigo; PRA = pulpa de remolacha azucarera; PCFL = pulpa de café fresca liofilizada; PCEL = pulpa de café ensilada liofilizada

La prueba de Tukey de comparaciones múltiples, nos indica que la actividad promedio CAE-I obtenida al utilizar la PCEL (1.5% p/v), no presenta diferencia significativa con la actividad promedio obtenida a partir del trigo sin salvado. Pero estas dos fuentes de inductores si presenta diferencia significativa con las actividades promedio de la PCEL (0.5% p/v), el salvado de trigo y la pulpa de remolacha azucarera.

Por otro lado, aunque que no existe diferencia significativa en los niveles de actividad CAE-I alcanzados al utilizar la pulpa de café ensilada (1.5% p/v) y el trigo sin salvado, la pulpa de café ensilada presenta la ventaja de alcanzar el valor máximo de actividad en un menor tiempo, lo cual hace que este subproducto, presente una productividad mayor a la obtenida con el trigo (Tabla 6.7).

En cuanto a las actividades CAE-I promedio obtenidas a partir de la PCEL (0.5% p/v), el salvado de trigo y la pulpa de remolacha azucarera, la prueba de Tukey nos indica que no

existe diferencia significativa entre las actividades CAE-I, obtenidas a partir de estas fuentes. Sin embargo, la pulpa de café ensilada (0.5% p/v), presenta nuevamente una productividad superior a la proporcionada por la pulpa de remolacha y por el salvado de trigo (Tabla 6.7).

Por otro lado la actividad CAE-I promedio obtenida a partir de la pulpa de café fresca y liofilizada presenta diferencia significativa con la actividad promedio obtenida a partir de la pulpa de café ensilada (0.5% p/v), pero no presenta diferencia significativa con las actividades CAE-I promedio obtenidas a partir del xilano de avena (OSX) y de la combinación xilano de avena y ácido ferúlico (OSX-AF). No obstante, la pulpa de café fresca presenta una mayor productividad con respecto al xilano de avena y a la combinación xilano de avena y ácido ferúlico. Lo anterior confirma que la pulpa de café ya sea fresca o ensilada, presenta la ventaja de proporcionar una mayor productividad CAE-I sobre las fuentes de tipo cereal y sobre la pulpa de remolacha.

De esta manera los resultados muestran que la inducción de la producción de CAE-I por *Aspergillus awamori* NRRL 3112, se encuentra favorecida al utilizar en el medio de cultivo una fuente de carbono como la pulpa de café, la cual es rica en lignina y celulosa, así como en ácido clorogénico y ácido caféico. En la literatura no se encuentran reportes acerca de la utilización de fuentes de carbono de tipo cereal y pulpa en la inducción de la producción de una cafeoil esterasa que sea capaz de romper el enlace éster entre los ácidos caféico y quínico. Sin embargo, si se ha evaluado la presencia de diferentes concentraciones de ácido clorogénico (entre 0-4g/L), en el medio de cultivo anaerobio para bacterias del intestino humano (Couteau *et al.*, 2001). En dicha investigación la actividad cafeoil esterasa I aumenta con la concentración de ácido clorogénico en el medio, alcanzando la actividad máxima a 4g/L. En el caso de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 se maneja en el medio de cultivo una concentración en ácido clorogénico de aproximadamente 0.4g/L (1.5% p/v de pulpa de café). En el caso de las bacterias del intestino humano, a una concentración de 0.4 g/L de ácido clorogénico en el medio de cultivo, se detecta la actividad CAE-I (0.01 mmol de ácido caféico/L de medio), a concentraciones menores de ácido clorogénico la actividad no fue detectada. Esta tendencia concuerda con los resultados obtenidos con la pulpa de café ensilada

a concentraciones de 0.5 y 1.5% p/v, en donde la actividad CAE-I, aumenta al incrementar también la concentración de los ácidos clorogénico y caféico.

Con respecto a las actividades CAE-II, FAE y *p*-CAE, éstas fueron detectadas con algunas de las fuentes tanto de tipo cereal como pulpa, utilizadas en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Sin embargo, los niveles de actividad fueron más bajos a los obtenidos en el caso de la CAE-I. La Tabla 6.7 presenta los valores máximos de actividad, así como los valores de productividad alcanzados tanto para las actividades CAE-II, FAE y *p*-CAE, como para la actividad CAE-I.

Tabla 6.7. Valores máximos de actividad y productividad de las cinamoil esterasas, obtenidos al utilizar diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112.

Fuente de carbono (1.5% p/v)	Actividad enzimática 10 ⁻³ U/mL				Productividad 10 ⁻³ U/día*mL			
	CAE-I	CAE-II	FAE	<i>p</i> -CAE	CAE-I	CAE-II	FAE	<i>p</i> -CAE
Xilano de avena	2	N.D.	2.5	N.D.	0.25	N.D.	0.23	N.D.
Xilano de avena- ácido ferúlico	5.5	N.D.	5.3	N.D.	0.55	N.D.	0.48	N.D.
Trigo sin salvado	19.3	N.D.	N.D.	N.D.	3.22	N.D.	N.D.	N.D.
Salvado de trigo	10.3	1.7	N.D.	3.3	1.72	0.24	N.D.	0.55
Pulpa de remolacha	9.8	3.3	1.8	4.9	1.23	0.37	0.26	0.54
Pulpa de café fresca	5.0	N.D.	N.D.	N.D.	1.25	N.D.	N.D.	N.D.
Pulpa de café ensilada	20.0	N.D.	N.D.	2.7	5.0	N.D.	N.D.	0.54
Pulpa de café ensilada (0.5% p/v)	11.8	N.D.	N.D.	N.D.	3.0	N.D.	N.D.	N.D.

En cuanto a la actividad CAE-II, únicamente al utilizar la pulpa de remolacha azucarera y el salvado de trigo como fuentes de carbono para el crecimiento de *Aspergillus awamori* NRRL 3112, se obtuvo dicha actividad. El resto de las fuentes de carbono probadas no permitió la obtención de la actividad CAE-II (Figura 6.11). El análisis de varianza indica que la actividad

enzimática promedio CAE-II obtenida a partir de la pulpa de remolacha presenta diferencia significativa con la actividad enzimática promedio obtenida a partir del salvado de trigo.

De acuerdo a la literatura, la pulpa de remolacha ha mostrado ser fuente de inductores de la producción de una cinamoil esterasa (CinnAE) que presenta actividad sobre el metil cafeato (Brézillon *et al.*, 1996), al utilizar la pulpa de remolacha en el medio de cultivo de *Aspergillus niger* CS 180. Sin embargo, la actividad obtenida es 7 veces mayor a la obtenida con *Aspergillus awamori* NRRL 3112. En cuanto al salvado de trigo, el nivel de actividad CAE-II coincide con los niveles reportados al utilizar este subproducto en el medio de cultivo de *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1996).

En el caso de la FAE, el xilano de avena, la combinación xilano de avena-ácido ferúlico y la pulpa de remolacha mostraron ser fuentes inductoras de la producción de la FAE, el resto de las fuentes de carbono probadas no permitieron la obtención de tal enzima (Figura 6.11).

La prueba de Tukey, indica que la actividad promedio obtenida a partir de la combinación OSX-AF presenta diferencia significativa con las actividades FAE promedio obtenidas a partir del OSX y de la pulpa de remolacha. A su vez la prueba indica que no existe diferencia significativa entre las actividades obtenidas a partir del OSX y de la pulpa de remolacha azucarera. Lo anterior concuerda con el valor superior de productividad que presenta la combinación OSX-AF con respecto a los valores obtenidos para el OSX y la pulpa de remolacha, los cuales a su vez son similares (Tabla 6.7).

Por lo que la adición de ácido ferúlico al medio de cultivo a una concentración de 0.03% p/v, permitió aumentar 2.12 veces la actividad FAE en comparación con los cultivos que contienen únicamente al xilano de avena. Este incremento en la actividad FAE, es aún mayor al incremento reportado por Faulds y Williamson (1999), en dicho trabajo al adicionar la misma concentración de ácido ferúlico al medio de cultivo de *Aspergillus niger*, la actividad FAE aumenta 1.2 veces.

Con respecto a la *p*-cumaroil esterasa, tres fuentes de carbono utilizadas en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* permitieron su producción. Éstas son la pulpa de remolacha, el

salvado de trigo y la pulpa de café ensilada y liofilizada, las tres a una concentración en el medio de 1.5% p/v, el resto de las fuentes no permitió detectar tal actividad (Figura 6.11).

La prueba de Tukey indica que la actividad *p*-CAE promedio obtenida a partir de la pulpa de remolacha no presenta diferencia significativa con la actividad enzimática promedio obtenida a partir del salvado de trigo, pero si presenta diferencia significativa con la actividad *p*-CAE promedio obtenida a partir de la pulpa de café ensilada y liofilizada (1.5% p/v). Sin embargo no obstante que la pulpa de café ensilada presenta un nivel de actividad más bajo que la pulpa de remolacha, presenta nuevamente la ventaja de alcanzar más rápidamente el nivel máximo de actividad, lo cual proporciona la misma productividad que con la pulpa de remolacha (Tabla 6.7). Así mismo la actividad promedio obtenida a partir del salvado de trigo no presenta diferencia significativa con la actividad promedio obtenida a partir de la pulpa de café ensilada (1.5% p/v) y la productividad es prácticamente la misma (Tabla 6.7).

Los niveles de actividad *p*-CAE obtenidos al utilizar el salvado de trigo en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* coinciden con los reportados al utilizar este subproducto en el medio de *Aspergillus niger* (Faulds y Williamson, 1996). En cambio los niveles obtenidos al utilizar la pulpa de remolacha en el medio de *Aspergillus awamori*, son 5 veces menores a los obtenidos en el caso de *Aspergillus niger* (Brézillon *et al.*, 1996).

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

7. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

La conclusión general así como las conclusiones particulares que derivan a partir de los resultados obtenidos en esta investigación se presentan a continuación:

Conclusión general:

Las producción de cafeoil-I, cafeoil-II, feruoil y *p*-cumaroil esterases es función de la fuente de carbono utilizada en el medio de cultivo de *Aspergillus awamori* NRRL 3112. Las diferentes fuentes de carbono probadas tanto de tipo cereal como pulpa inducen principalmente la producción de la cafeoil esterasa I, a excepción del xilano de avena y la combinación xilano de avena-ácido ferúlico que permiten la producción en los mismo niveles tanto de la cafeoil esterasa I como de la feruoil esterasa. La producción de cafeoil-II, feruoil y *p*-cumaroil esterases se obtiene en niveles menores.

Conclusiones particulares:

- 1) La técnica espectrofotométrica desarrollada para la determinación de las actividades cafeoil I, cafeoil II, feruoil y *p*-cumaroil esterases, permiten la medición de consumo de sustrato y de formación de producto por cada una de las cinamoil esterasa con un error mínimo.
- 2) *Aspergillus awamori* NRRL 3112 es capaz de utilizar al xilano de avena como inductor de la producción de cafeoil esterasa I, mientras que *Aspergillus niger* Aa20 y *Penicillium commune* V33A25 no utilizaron al xilano de avena como inductor de la producción de esta enzima.
- 3) Las principales fuentes de inductores de la producción de la cafeoil esterasa I en *Aspergillus awamori* fueron la pulpa de café ensilada y el trigo sin salvado, ambas a 1.5% p/v, siendo mayor la productividad con la pulpa de café ensilada ($5 \times 10^{-3} \text{U/día} \cdot \text{mL}$) que con el trigo sin salvado ($3.22 \times 10^{-3} \text{U/día} \cdot \text{mL}$).
- 4) La mejor fuente de inductores de la producción de la feruoil esterasa fue la combinación xilano de avena-ácido ferúlico. Así mismo la adición de ácido ferúlico al medio de cultivo en

presencia de xilano de avena aumenta la producción de cafeoil esterasa I y feruoil esterasa en un 175 y 112% respectivamente.

5) La producción de la cafeoil esterasa II, fue inducida principalmente al utilizar la pulpa de remolacha y en segundo lugar el salvado de trigo, el resto de las fuentes no indujo la producción de esta enzima.

6) La producción de *p*-cumaroil esterasa fue inducida al utilizar el salvado de trigo, la pulpa de remolacha y la pulpa de café ensilada a una concentración en el medio de 1.5% p/v, siendo la productividad proporcionada por las tres fuentes la misma.

7) En el caso de la pulpa de café ensilada, la producción de cafeoil esterasa I, parece ser función de la concentración de pulpa en el medio de cultivo.

8) La pulpa de café ensilada a una concentración de 1.5% p/v proporciona un aumento en la producción de CAE-I cuatro veces superior sobre la producción de la misma enzima al utilizar la pulpa de café fresca.

Perspectivas:

Las perspectivas de este trabajo son diversas. Una nueva etapa puede consistir en aumentar los títulos de actividad cinamoil esterasa, principalmente de las actividades cafeoil I, cafeoil II y *p*-cumaroil esterases de *Aspergillus awamori* NRRL 3112 modificando las condiciones del cultivo o utilizando otras cepas filogenéticamente próximas, utilizando como fuentes de carbono a la pulpa de café, la pulpa de remolacha y el salvado de trigo

Otra etapa interesante consiste en la purificación y la caracterización enzimática, lo cual proporcionará información en cuanto al número de enzimas inducidas al utilizar las fuentes de carbono antes citadas, así como de la especificidad de sustrato.

Otro parámetro a evaluar en estudios posteriores es el efecto de la adición de ácido caféico y clorogénico al medio cultivo, esto con el fin de evaluar si su presencia en el medio provoca un

efecto de regulación positiva o bien de inhibición de las actividades cafeoil I cafeoil II, feruol y *p*-cumaroil esterasas.

Otra perspectiva de gran interés consiste en la liberación de los ácidos hidroxicinámicos principalmente caféico presentes en la pulpa de café ensilada, utilizando para ello la acción enzimática del sobrenadante proveniente del medio de cultivo, en el cual se utilice a la pulpa de café ensilada como fuente de carbono para el crecimiento de *Aspergillus awamori*. En esta misma etapa otro factor a estudiar puede ser la utilización de enzimas hidrolasas comerciales tales como xilanasas, endoarabinanasas y arabinofuranosidasas, las cuales al actuar de manera sinérgica con las cinamoil esterasas faciliten la degradación de la pared celular, permitiendo así la liberación de antioxidantes naturales como los ácidos hidroxicinámicos.

Así mismo el sobrenadante proveniente a partir de los cultivos que contengan pulpa de remolacha y salvado de trigo podrían también ser probados sobre la pulpa de café, a fin de liberar por vía enzimática los ácidos hidroxicinámicos de la pulpa de café ensilada o de otros subproductos de interés a valorizar como el salvado de maíz, el salvado de trigo y el bagazo de caña.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aliwan F.O., Kroon P.A., Faulds C.B. Richard P., Williamson G. (1999), Ferulic acid esterase-III from *Aspergillus niger* does not exhibit lipase activity. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 457-459

Arts I.C.W., Putte B., Hollman P.C.H. (2000), Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1752-1757

Auerbach R.H., Gray D.A. (1999), Oat antioxidant extraction and measurement towards a commercial process. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 385-389

Ayres G.H. (1970), Análisis Químico Cuantitativo. Harla, México, pp. 459-493

Bartolomé B., García-Conesa M.T., Williamson G. (1996), Release of the bioactive compound, ferulic acid, from malt extracts. *Biochem. Soc. Transact.*, 24: 379S

Barreto-Castro M.R. (2001), Utilización de la pulpa de café como complemento en dietas para crias de tilapia *Oreochromis niloticus*. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, 81 p.

Bellido L.L. (1991), Cultivos herbáceos, Cereales. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 495-506

Bonnin E., Lesage-Meessen L., Asther M., Thibault J.F. (1999), Enhanced bioconversion of vanillic acid into vanillin by the use of natural cellobiose. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 484-486

Borneman W.S., Hartley R.D., Himmelsbach D.S., Ljungdahl L.G. (1990a), Assay for trans-*p*-coumaroyl esterase using a specific substrate from plant cell walls. *Analytical Biochemistry*, 190: 129-133

Borneman W.S., Hartley R.D., Morrison W.H., Akin D.E., Ljungdahl L.G. (1990b), Feruloyl and *p*-coumaroyl esterase from anaerobic fungi in relation to plant cell wall degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33: 345-351

Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E. (1991), Isolation and Characterization of *p*-coumaroyl esterase from the Anaerobic Fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2337-2344

Borneman W.S., Ljungdahl L.G., Hartley R.D., Akin D.E. (1992), Purification and partial characterization of two feruloyl esterases from the anaerobic fungus *Neocallimastix* strain MC-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3762-3766

Bressani R., Braham J.E. (1980), Utilization of coffee pulp as animal feed. ASIC, 9^o Colloque, London

Brézillon C., Kroon P.A., Faulds C.B., Brett G.M., Williamson G. (1996), Novel ferulic acid esterase are induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. Appl. Microbiol. Biotechnol., 45: 371-376

Castanares A., McCrae S.I., Wood T.M. (1992), Purification and properties of a feruloyl/*p*-coumaroyl esterase from the fungus *Penicillium pinophilum*. Enzyme Microb. Technol., 14: 875-884

Clifford M.N. (1999), Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric., 79: 362-372

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

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

Delgado-Vidal F. (1999), Variación de la composición química de la pulpa de café sometida a procesos fermentativos. Tesis de Licenciatura, Benemerita Universidad Autónoma de Puebla, 56 p.

Deobald L.A., Crawford D.L. (1987), Activities of cellulase and other extracellular enzymes during lignin solubilization by *Streptomyces viridosporus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26: 158-163

Donnelly P.K., Crawford D.L. (1988), Production by *Streptomyces viridosporus* T7A of an enzyme which cleaves aromatic acid from lignocellulose. Appl. Environ. Microbiol., 54: 2237-2244

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

Faulds C.B., Williamson G. (1993), Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger* : purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase. Biotechnol. Appl. Biochem. 17: 349-359

Faulds C.B., Williamson G. (1994), Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-III) from *Aspergillus niger*: specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose. Microbiology, 140: 779-787

- Faulds C.B., Williamson G. (1996), A major bioactive component of plant cell walls, ferulic acid, influences feruloyl esterase production in *Aspergillus niger*. *Biochem. Soc. Transact.*, 24: 386S
- Faulds C.B., Vries R.P., Kroon P.A., Visser J., Williamson G. (1997), Influence of ferulic acid on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 157: 239-244
- Faulds C.B., Williamson G. (1999), Effect of hidroxycinnamates and benzoates on the production of feruloyl esterases by *Aspergillus niger*. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 450-452
- Favela E., Huerta S., Roussos S., Olivares G., Nava G., Viniestra G., Gutiérrez-Rojas M. (1989), Producción de enzimas a partir de la pulpa de café y su aplicación en la industria cafetalera. In Roussos S., Licon F.R. y Gutiérrez R.M., (eds), I Seminario Internacional de Biotecnología en la Industria Cafetalera, Memorias, Xalapa, Veracruz, pp. 145-151
- Ferreira L.M.A., Wood T.M., Williamson G., Faulds C.B., Hazlewood G.P., Gilbert H.J. (1993), A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *Cellulosa* contains a non-catalytic cellulose binding domain. *Biochem. J.*, 249: 349-355
- Ferreira P., Diez N., Gutiérrez C., Soliveri J., Copa-Patiño J.L. (1999), *Streptomyces Avermitilis* 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
- Figuroa-Espinoza M.C., Morel M.H., Surget A., Rouau X. (1999), Oxidative cross-linking of wheat arabinoxylans by manganese peroxidase. Comparison with laccase and horseradish peroxidase. Effect of cysteine and tyrosine on gelation. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 460-463
- Fischer H.O.L., Dangschat G. (1932), Konstitution der Chlorogensäure (3. Mitteil über Chinasäure und Derivate). *Berichte*, 65: 1037-1040
- Friedman M., Jürgens H.S. (2000), Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2101-2110
- Gasson M.J., Kitamura Y., McLauchlan W.R., Narbad A., Parr A.J., Parsons E.L.H., Payne J., Rhodes M.J., Walton N.J. (1998), Metabolism of ferulic acid to vanillin. *J. Biol. Chem.*, 273: 4163-4170
- Guerrero A. (1992), Cultivos herbáceos extensivos, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riechel T.L. (1998), High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1887-1892

- Haslam E. (1993), Polyphenol complexation, in A. Scalbert (eds.) *Polyphenolic phenomena*, INRA, France, pp 23-31
- Hatfield R.D., Ralph J., Grabber J.H. (1999), Review: Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 403-407
- Hendry G.A.F. (1993), Plant pigments, in Lea P.J. y Leegood R.C. (eds) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, Wiley and Ltd., pp 181-196
- Ingold K.U. (1968), Inhibition of autoxidation. *Adv. Chem. Ser.*, 75: 296-305
- Ishii T., Hiroi T. (1990), Linkage of phenolic acids to cell-wall polysaccharides of bamboo shoot. *Carbohydr. Res.*, 206: 297-310
- Ishii T. (1997), Structure and functions of feruloylated polysaccharides. *Plant Science*, 127: 111-127
- Johnson K.G., Harrison B.A., Schneider H., MacKenzie C., Fontana J.D. (1988), Xylan-hydrolysing enzymes from *Streptomyces* spp. *Enzyme and Microbial Technology*, 10: 403-409
- Juge N., Williamson G., Puigserver A., Cummings N.J., Connerton I.F., Faulds C.B. (2001), High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 1: 127-132
- Kroon P.A., Williamson G. (1996), Release of ferulic acid from sugar-beet pulp by using arabinanase, arabinofuranosidase and an esterase from *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 23: 263-267
- Kroon P.A., Faulds C.B., Williamson G. (1996), Purification and characterization of a novel esterase induced by growth of *Aspergillus niger* on sugar-beet pulp. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 23: 255-262
- Kroon P.A., Garcia-Conesa M.T., Fillinghan I.J., Hazlewood G.P., Williamson G. (1999), Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases. *J. Sci. Food Agric*, 79: 428-434.
- Kroon P.A., Williamson G. (1999), Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric*, 79: 355-361.
- 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 : a review, in T. Sera, C.R. Soccol, A. Pandey y S. Roussos (eds.) *Coffee Biotechnology and Quality*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 517-531

Lapierre C., Pollet B., MacKay J.J., Sederoff R.R. (2000), Lignin structure in a mutant pine deficient in cinnamyl alcohol dehydrogenase. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2326-2331

Latif Abd S.S., Lugasi A., Hóvári J., Dworchák E. (1999), Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 277-285

MacKenzie C.R., Bilous D. (1988), Ferulic acid esterase from *Schizophyllum commune*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1170-1173

McCrae S.I., Leith K.M., Gordon A.H., Wood T.M (1994), Xylan-degrading enzyme system produced by the fungus *Aspergillus awamori*: isolation and characterization and *p*-coumaroyl esterase. *Enzyme Microb. Technol.*, 16: 826-834

Mort A.J., Komalavilas P., Rorrer G.L., Lamport D.T.A. (1989), Anhydrous hydrogen fluoride and cell wall analysis: a review, in H.F. Linskens y J.F. Jackson (eds.) *Plant fibers*, Springer-Verlag, pp 37-69

Murga R., Ruiz R., Beltrán S., Cabezas J.L. (2000), Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 3408-3412

Nacz M., Amarowicz R., Pink D., Shahidi F. (2000), Insoluble condensed tannins of Canola/Rapeseed. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 1758-1762

Okuda O., Yoshida T., Hatano T. (1992), Polyphenols from Asian plants (structural diversity and antitumor and antiviral activities). *Amer. Chem. Soc. Symp. series 507*, pp.160-183

Payen S. (1846), Mémoire sur le café (3° Part). *Comptes rendus*, 23: 244-251

Perraud-Gaime I. (1995), Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, 210 p.

Perraud-Gaime I., Saucedo-Castañeda G., Augur C., Roussos S. (2000), Adding value to coffee solid by-products through biotechnology. In T. Sera, C.R. Soccol, A. Pandey y S. Roussos (eds.) *Coffee Biotechnology and Quality*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 437-446

- 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
- Robiquet y Boutron (1837), Ueber den Kaffee von Robiquet und Boutron. *Ann. Pharmacie*, 23: 93-95
- Roussos S., Aquíhuatl M.A., Trejo-Hernández M.R., Gaime Perraud I., Favela E., Ramakrishna., Raimbault M., Viniegra-González 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: 756-762
- Saija A., Tomaino A., Lo Cascio R., Trombetta D., Proteggente A., De Pasquale A., Uccella N., Bonina F. (1999), Feruloyl and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 476-480
- Sancho A.I., Faulds C.B., Bartolomé B., Williamson G. (1999), Characterisation of feruloyl esterase activity in barley. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 447-449
- Sancho A.I., Bartolomé B., Gómez-Cordovés C., Williamson G., Faulds C.B. (2001), Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. *J. Cereal Sci.*, 34: 173-179
- Saulnier L., Thibault J.F. (1999), Ferulic acid and diferulic acids as components of sugar-beet pectins and maize bran heteroxylans. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 396-402
- Saulnier L., Marot C., Elgorriaga M., Bonnin E., Thibault J.F. (2000), Thermal enzymatic treatments for the release of free ferulic acid from maize bran. *Carbohydrate Polymers*, 00
- Sera T., Soccol C.R., Pandey A., Roussos S. (2000) *Coffee Biotechnology and Quality*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 538p.
- Strack D. (1997), Phenolic metabolism, in Dey P.M. y Harborne J.B. (eds.) *Plant Biochemistry*, Academic Press, pp 388-416
- Tenkanen M., Schuseil J., Puls J., Poutanen K. (1991), Production, purification and characterisation of an esterase liberating phenolic acids from lignocellulosics. *J. Biotechnol.*, 18: 69-84
- Thibault J.F., Asther M., Ceccaldi B.C., Couteau D., Delattre M., Duarte J.C., Faulds C. B., Heldt-Hansen H.P., Kroon P., Lesage-Meessen L., Micard V., Renard C., Tuohy M., Van Hulle S., Williamson G. (1998), Fungal bioconversion of agricultural by-products to vanillin. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 31: 530-536

Vries R.P., Faulds C.B., Visser J. (1999), The *fae A* gene from *Aspergillus niger* encoding a feruloyl esterase with activity on xylan and pectin is subject to a complex system of regulation. *J. Sci. Food Agric.*, 79: 443-446

Waterman P.G. (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications, Oxford, U.K., p.p. 1-16

Williamson G., Faulds C.B., Kroon P.A. (1998), Specificity of ferulic acid (féruloyl) esterases. *Biochem. Soc. Transact.*, 26 (2): 205-209