

CK

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



Casa abierta al tiempo

**“DEGRADACIÓN DE CAFEÍNA EN PRESENCIA DE ÁCIDO  
TÁNICO, POR *Penicillium commune*, V33A25”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA  
PRESENTA  
GERARDO GUTIÉRREZ SÁNCHEZ

SUSTENTADA EL 7 DE SEPTIEMBRE DEL 2000,  
ANTE EL JURADO FORMADO POR

DR. GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA      DIRECTOR DE TESIS

DR. ARMANDO MEJÍA ÁLVAREZ  
DR. DANIEL MARTÍNEZ CARRERA  
DRA. ISABELLE GAIME PERRAUD  
DR. CHRISTOPHER AUGUR

PRESIDENTE  
SECRETARIO  
VOCAL  
VOCAL

El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está  
incluido 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 comunicación de resultados que presentó:

Gerardo Gutiérrez Sánchez

El día 7 de septiembre del 2000

Comité Tutorial:

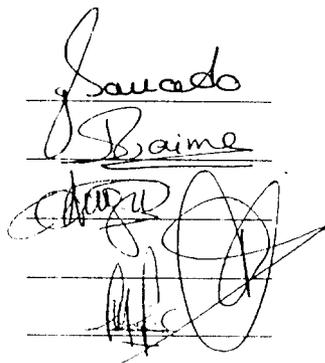
Tutor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda

Asesor: Dra. Isabelle Gaime Perraud

Asesor: Dr. Christopher Augur

Sinodal: Dr. Daniel Martínez Carrera

Sinodal: Dr. Armando Mejía Álvarez



Handwritten signatures of the committee members, including Saucedo, Gaime, Augur, Martínez Carrera, and Mejía Álvarez, each on a horizontal line.

*A Dios*

*A Ely, mi amiga y esposa*

*A mis padres y herman(a)os*

*El éxito no es resultado de la combustión  
espontánea,  
Uno mismo se tiene que prender fuego.*

## AGRADECIMIENTOS:

*Al Dr. Gerardo Saucedo Castañeda, por compartir conmigo su riqueza tanto profesional como de ser humano.*

*A la Dra. Isabelle Guime Perraud, por su gran apoyo y consejos a lo largo de estos años de trabajo.*

*Al Dr. Christopher Augur, por sus muy acertados comentarios y correcciones durante mi trabajo.*

*Al Dr. Daniel Martínez Carrera y al Dr. Armando Mejía Álvarez, por su colaboración y acertadas observaciones a mi trabajo.*

*A todos y cada uno de los integrantes de la Planta Piloto de Fermentaciones Sólidas de la UAM, por su buen sentido del humor y sus porras especialmente a Neto, Sergio, Arely, Doña María Elena, Tania, Cristóbal, Oscar, Juan Romano y Luciano.*

# CONTENIDO

CONTENIDO .....	vi
PRESENTACIÓN DEL PROYECTO .....	xi
RESUMEN .....	xii
<i>CAPÍTULO 1</i>	
1. INTRODUCCIÓN .....	1
<i>CAPÍTULO 2</i>	
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	5
2.1. El café en México .....	6
2.2. La pulpa de café .....	7
2.3. La cafeína .....	9
2.3.1. Química de la cafeína .....	10
2.3.2. Efectos biológicos de la cafeína .....	12
2.4. Catabolismo de la cafeína .....	13
2.4.1. Degradación por las plantas .....	13
2.4.2. Degradación por el hombre .....	15
2.4.3. Degradación por las bacterias .....	17
2.4.4. Degradación por los hongos filamentosos .....	18
2.5. Los compuestos fenólicos .....	21
2.6. Los taninos .....	22
2.6.1. Clasificación de los taninos .....	22
2.6.2. Efectos tóxicos y antimutricionales de los taninos .....	24
2.6.3. Degradación de los taninos .....	26

2.6.4. <i>La tanasa</i> .....	26
2.7. Los hongos filamentosos .....	28
2.7.1. <i>Regulación genética del metabolismo del nitrógeno en los hongos</i> .....	28
2.7.2. <i>El género Penicillium</i> .....	29
2.7.3. <i>Usos biotecnológicos de Penicillium</i> .....	30
2.8. Conclusión .....	30
<b>CAPÍTULO 3</b>	
3. OBJETIVOS .....	38
3.1. Objetivo general .....	39
3.2. Objetivos particulares .....	39
<b>CAPÍTULO 4</b>	
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	34
4.1. Microorganismos .....	35
4.2. Conservación de las cepas .....	36
4.3. Composición y preparación de los medios de cultivo .....	37
4.3.1. <i>Medio infusión de pulpa de café – agar (medio Aa)</i> .....	38
4.3.2. <i>Medio infusión de pulpa de café (medio A)</i> .....	39
4.3.3. <i>Medio infusión de café – sacarosa – agar (medio Ba)</i> .....	39
4.3.4. <i>Medio infusión de café – sacarosa (medio B)</i> .....	39
4.3.5. <i>Medio infusión de café – ácido tánico – agar (medio C)</i> .....	39
4.3.6. <i>Medio cafeína – ácido tánico (medio D)</i> .....	40
4.3.7. <i>Medio cafeína – sacarosa (medio E)</i> .....	40
4.3.8. <i>Medio sulfato de amonio – ácido tánico (medio F)</i> .....	40
4.3.9. <i>Medio sulfato de amonio – sacarosa (medio G)</i> .....	40
4.3.10. <i>Medio cafeína, sulfato de amonio – ácido tánico, sacarosa (medio H)</i> .....	40
4.4. Condiciones de cultivo .....	41
4.4.1. <i>Crecimiento radial</i> .....	41
4.4.2. <i>Crecimiento longitudinal</i> .....	42
4.4.3. <i>Evaluación de la capacidad de degradar la cafeína</i> .....	43

4.4.3.1. Degradación de la cafeína en el medio infusión pulpa de café (medio A) .....	43
4.4.3.2. Degradación de la cafeína en el medio infusión café sacarosa (medio B) .....	44
4.4.4. Efecto del método de conservación y adaptación de <i>Penicillium commune</i> V33.125, sobre la degradación de la cafeína .....	44
4.4.5. Degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico .....	45
<b>4.5. Tratamiento de las muestras</b> .....	46
<b>4.6. Técnicas analíticas</b> .....	47
4.6.1. Peso seco .....	47
4.6.2. pH .....	48
4.6.3. Extracción y análisis de la cafeína por HPLC .....	48
4.6.4. Análisis de ácido tánico y sacarosa .....	49
4.6.5. Actividad Cafeín-desmetilasa (CD) .....	51
4.6.6. Actividad Tannin-acil-hidrolasa (TAH) .....	52
4.6.7. Análisis de ácido gálico por HPLC .....	53
<b>4.7. Expresión de resultados</b> .....	54
4.7.1. Cálculo de la velocidad de crecimiento radial y longitudinal .....	54
4.7.2. Cálculo de tasa volumétrica de consumo de la cafeína y de la fuente de carbono .....	54
4.7.3. Cálculo de la actividad Cafeín-desmetilasa (CD) .....	54
4.7.4. Cálculo de la actividad Tannin-acil-hidrolasa (TAH) .....	55
4.7.5. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) .....	55
4.7.6. Cálculo de los coeficientes $\alpha$ , $\beta$ y $\alpha^*\mu$ del modelo de Luedeking y Piret .....	56
<b>4.8. Estrategia experimental</b> .....	58
<b>CAPÍTULO 5</b>	
<b>5. SELECCIÓN DE CEPAS</b> .....	60
<b>5.1. Primera fase de selección de cepas: crecimiento radial y longitudinal</b> .....	61
5.1.1. Velocidad de crecimiento radial y longitudinal .....	61

5.1. Relación entre la velocidad de crecimiento y radiación incidente	64
5.2. Segunda fase de selección de cepas: capacidad de degradación de la cafeína	66
5.2.1. Evaluación de la capacidad de degradación de la cafeína	67
5.2.2. Comprobación de la capacidad de adaptación de las cepas	69
5.3. Conclusión	71
<i>CAPÍTULO 6</i>	
6. EFECTOS DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y ADAPTACIÓN DE <i>Penicillium commune</i> , SOBRE LA DEGRADACIÓN DE LA CAFEÍNA	74
6.1. Métodos de cultivo y métodos de conservación y adaptación	75
6.2. Cinética de degradación de la cafeína observada en los diferentes métodos de conservación y adaptación	75
6.3. Efecto de la relación C/N, sobre la velocidad de degradación de la cafeína	78
6.4. Conclusión	80
<i>CAPÍTULO 7</i>	
7. DEGRADACIÓN DE LA CAFEÍNA EN PRESENCIA DE ÁCIDO TÁNICO: EFECTOS DE LA ADICIÓN DE LAS FUENTES DE NITRÓGENO Y CARBONO SIMPLES	81
7.1. Métodos de adaptación y de cultivo	83
7.2. Caseína como fuente de nitrógeno	85
7.2.1. Producción de biomasa	85
7.2.2. Consumo de la fuente de carbono y nitrógeno, y producción de enzimas (amino-acil-hidrolasa y metiltransferasa)	87
7.3. Sulfato de amonio como fuente de nitrógeno	89
7.3.1. Producción de biomasa	89
7.3.2. Consumo de la fuente de carbono y producción de enzimas (amino-acil-hidrolasa)	91
7.4. Caseína-metilasa (CD), ¿producto asociado al crecimiento?	96
7.5. Conclusión	100
<i>CAPÍTULO 8</i>	
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	102

*Capítulo 9*

9. BIBLIOGRAFÍA .....	106
ANEXOS .....	116
LISTA DE FIGURAS .....	A1
LISTA DE TABLAS .....	A2
ABREVIACIONES .....	A3



---

## PRESENTACIÓN DEL PROYECTO

---

La Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAM-I) ha trabajado con el Instituto de Investigación para el Desarrollo, IRD (l'Institut de Recherche pour le Développement, ex-ORSTOM) por más de 17 años en programas de Biotecnología.

Esta tesis, se desarrolla dentro del proyecto denominado "Desarrollo de bioprocesos para la conservación, detoxificación y valorización de la pulpa de café (BIOPULCA)". El objetivo global del proyecto tiene como finalidad aprovechar la pulpa de café mediante procesos Biotecnológicos y uno de los intereses dentro de este proyecto es el de eliminar los compuestos antifisiológicos (cafeína) y antinutricionales (compuestos fenólicos) que contiene la pulpa de café. El proyecto BIOPULCA, se encuentra apoyado financieramente dentro de un proyecto de la Unión europea (BIOPULCA # IC18\*CT970185) y se colabora con el Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD-Francia), la Universidad de Reading (UR-Inglaterra), la Universidad Federal de Paraná (UFPR-Brasil) y la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAMI-México).

Esta Tesis de Maestría, fue realizada en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa en la Planta Piloto de Fermentaciones Sólidas (PP4) y en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos Filamentosos.

## RESUMEN

Este trabajo gira sobre la selección de un hongo filamentosos con capacidad de degradar la cafeína en presencia de ácido tánico.

La primera fase de selección de cepas, consistió en evaluar diez cepas de hongos filamentosos, mediante dos tipos de evaluación del crecimiento: radial y longitudinal, considerando la velocidad de invasión sobre un medio sólido preparado a partir de pulpa de café, como criterio de selección; debido a que el microorganismo se utilizará en estudios posteriores de fermentación en medio sólido.

Para la segunda fase de selección de cepas se tomó como criterio, la capacidad del microorganismo para degradar la cafeína. *Penicillium commune* V33A25, presentó el mayor porcentaje de degradación de cafeína (96 %) presente un medio preparado a partir de una infusión de café, y se consideró que la velocidad de invasión del sustrato por el hongo, no está directamente relacionada con la capacidad de utilizar la cafeína.

Para que el *P. commune* V33A25, no pierda la capacidad de degradar la cafeína, se proponen dos métodos de conservación: a corto y a largo plazo. Para conservar el microorganismo por periodos cortos, se propone conservar la cepa de *P. commune* V33A25, utilizando en un medio preparado a partir de una infusión de café con sacarosa y agar. De esta manera habrá un periodo de retardo corto en la degradación de la cafeína. Para conservar el hongo por periodos largos, se propone crecer el microorganismo sobre un medio de infusión de café con agar, colectar las esporas y liofilizarlas.

Por otra parte, se observó que al utilizar un medio de cultivo con sacarosa y cafeína anhidra, con una relación C/N de 50, se mejoró la velocidad de degradación de cafeína, por lo cual, la degradación del alcaloide se realiza en un menor tiempo.

En la última parte experimental, si *P. commune* V33A25 es cultivado previamente en un medio de infusión de café con agar y posteriormente se resiembró en un medio de infusión de café

con ácido tánico y agar, para finalmente inocular un medio con sacarosa como fuente de carbono, se observó que tanto el consumo de la sacarosa como la producción de biomasa fueron bajos, lo cual puede deberse al manejo del microorganismo.

Cuando al medio con cafeína anhidra y sacarosa, se le adicionó  $0.137 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio y  $3.413 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, con lo cual se aporta el 10% de la fuente de nitrógeno y carbono total, respectivamente, se mejoró considerablemente el nivel de degradación de la cafeína y el consumo de la fuente de carbono. Bajo estas condiciones de cultivo, el modelo de Gompertz se ajusta a los datos experimentales de producción de biomasa y producción de la enzima de interés, cafeín-desmetilasa.

La actividad enzimática cafeín-desmetilasa, de acuerdo al modelo de Luedeking y Piret, está asociada al crecimiento, cuando el microorganismo crece en el *medio mixto* (cafeína, sulfato de amonio, ácido tánico y sacarosa).

Al utilizar el cultivo en medio líquido como modelo de estudio, permitirá caracterizar de manera más precisa el comportamiento del microorganismo, esto contribuirá al diseño, implementación y operación de bioprocesos para el aprovechamiento de la pulpa de café, así como mejorar su calidad nutricional.



# *CAPÍTULO 1*

---

## *INTRODUCCIÓN*

## INTRODUCCIÓN

Durante 1997-98, en México se produjeron 4'800,900 sacos de 60 kilos de café pergamino seco, colocando a México como el quinto productor mundial de este grano. Considerando el porcentaje de café pergamino que se obtiene del café cereza, 22% y tomando en cuenta el porcentaje de la pulpa de café que conforma el fruto fresco de café, 39% (Zuluaga, 1989) se puede estimar que durante la cosecha de 1997-98, en México se obtuvieron alrededor de 510,641 toneladas de pulpa de café fresca. Este subproducto de la agroindustria del café, ha constituido un serio problema de contaminación de suelos y agua, ya que frecuentemente es vertida en los ríos o depositada en caminos vecinales de los beneficios. Se ha sugerido que el mejor aprovechamiento de la pulpa es su transformación en abono sin que esto sea atractivo para los beneficios de café (Nolasco, 1985).

Los mayores esfuerzos de investigación sobre la utilización de la pulpa de café se han dirigido hacia su uso en nutrición animal, principalmente en rumiantes, debido a que en ella se encuentran algunos nutrientes como azúcares libres, proteínas, hemicelulosa y celulosa (Elías, 1979; Zuluaga, 1989) que son atractivos para los animales que la consuman. A la par de estas ventajas, la pulpa presenta también ciertas desventajas, como son la presencia de cafeína, taninos y otros compuestos fenólicos a los que se les ha responsabilizado de causar un efecto adverso en los animales que la consumen, ya que los nutrientes presentes en la pulpa están estrechamente ligados con la cafeína y los compuestos fenólicos, moléculas que pueden provocar efectos antifisiológicos y antinutricionales, respectivamente (Bressani, 1979; Vargas *et al.*, 1982), dando como resultado un bajo consumo de alimento y baja ganancia en peso a medida que se incrementa el porcentaje de pulpa en la ración.

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide sintetizado por más de 70 especies de vegetales, las especies más conocidas pertenecen al género *Coffea* (café) y *Camellia* (té). En el café, la cafeína se localiza en las hojas, los granos, pero también en el fruto del café: la

pulpa de café. La cafeína es principalmente conocida por sus efectos sobre el sistema nervioso central. Sin embargo, como la mayoría de las sustancias activas, la cafeína presenta efectos indeseables (aumento en la orina, problemas para conciliar el sueño, excitación, etc.)

Por otra parte, los taninos son compuestos fenólicos presentes en vegetales o productos de origen vegetal. La abundancia de los taninos en los vegetales, se ha relacionado con mecanismos de defensa de las plantas contra el ataque de insectos y o rumiantes. Algunas de las características de los taninos sobre los sistemas biológicos son las siguientes: potentes queladores de iones metálicos, agentes precipitantes de proteínas y antioxidantes biológicos (Hagerman y Carlson, 1998). Los taninos tienen impacto negativo sobre la nutrición debido a su capacidad para formar complejos con numerosos tipos de moléculas, incluyendo pero no limitado a carbohidratos, proteínas, polisacáridos, membranas celulares de bacterias, enzimas involucradas en la digestión de proteínas y carbohidratos.

El ácido tánico es el más común de los taninos y pertenece al grupo de los galotaninos, ya que su estructura consta de una molécula de glucosa unida a nueve moléculas de ácido gálico por medio de enlaces tipo éster.

En los últimos años, se han realizado estudios de aislamiento de cepas de hongos filamentosos, capaces de degradar la cafeína en medios sintéticos (Aquiaguatl, 1992; Roussos *et al.*, 1995). También sobre la degradación de la cafeína presente en la pulpa de café (Roussos *et al.*, 1994; Gaime, 1995), entre otros, pero no se ha realizado ningún estudio en el cual se consideren además de la cafeína, a los polifenoles y/o taninos presentes en la pulpa de café.

El principal objetivo de este trabajo fue seleccionar un hongo filamentosos con la capacidad de degradación de cafeína, en presencia de ácido tánico y utilizando un modelo matemático, establecer si la producción de la enzima "cafeín-desmetilasa", está total o parcialmente asociada al crecimiento.

Primeramente se realizó una selección de cepas que tuvieran las siguientes características: 1) crecer sobre un medio de cultivo sólido preparado a partir de pulpa de café y, 2) que tengan la capacidad de degradar la cafeína. En la primera fase de la selección de cepas, se utilizaron diez cepas de hongos filamentosos, y se evaluó la capacidad de los hongos para invadir un medio de cultivo sólido preparado a partir de pulpa de café, utilizando dos tipos de evaluación del crecimiento: crecimiento radial y crecimiento longitudinal. Una vez seleccionadas las

cepas, se sembraron sobre un medio de infusión de café con agar, para evidenciar de una forma rápida aquellas cepas que pudiesen degradar la cafeína. La segunda fase de la selección, consistió en seleccionar una cepa teniendo como criterio la capacidad de degradación de la cafeína, seleccionando así el hongo que presentara el mayor nivel de degradación de cafeína. Enseguida, se estudió si una vez expresada la capacidad de degradar la cafeína por el hongo filamentoso seleccionado, esta actividad se modifica por el método de conservación y adaptación utilizado, con lo cual se propone dos métodos de conservación y adaptación. Posteriormente se estudió la degradación de cafeína en presencia de ácido tánico, evaluando también el efecto de la adición de fuentes de nitrógeno y/o carbono simple sobre la degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico. La presencia en el medio de una fuente de nitrógeno simple y la presencia de una fuente de carbono y energía, también simple, pueden estimular el crecimiento del microorganismo, con lo cual, se mejorarían los niveles de degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico.

Los análisis de los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo, deberá finalmente, permitir una mejor evaluación del potencial de los hongos filamentosos que presentan la particularidad de degradar la cafeína en presencia de ácido tánico y la consecuencia de utilizarlos como medio para valorizar la pulpa de café.

*CAPÍTULO 2*

---

*REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En este artículo bibliográfico se presentará la importancia del café en México y la posibilidad de utilizar la producción de café generada por esta agroindustria, así como los problemas anti-parásitos y anti-bacterianos que pueden ser ocasionados por la cafeína y los alcaloides presentes en este subproducto, cuando es incorporado en la dieta de animales. En seguida se presentarán las características de estas dos moléculas de estudio y finalmente trataremos a las generalidades de los hongos filamentosos.

### 1. EL CAFÉ EN MÉXICO

El café es uno de los cultivos tropicales más importantes no sólo para los 56 países productores del Tercer Mundo sino también para Estados Unidos, Europa y Japón, los cuales consumen el 80% del café producido. En la década pasada el café generó uno de los más importantes ingresos para las economías locales de más de cincuenta países tropicales, perdido en algunos casos sólo por el petróleo y el turismo (Moguel y Toledo, 1999). México ocupaba en día el quinto lugar en el mundo por su producción (después de Brasil, Colombia, India y Vietnam) y el tercer lugar en el mundo por su consumo. También ocupa el quinto lugar por la superficie cosechada y el noveno por su rendimiento. A nivel nacional, el café generó en la década de los ochenta el 36% del valor de las exportaciones agrícolas y ocupó el quinto sitio en superficie antecedido solo por el maíz, el frijol, el sorgo y el trigo. Como generador de divisas el café produjo entre 285 (1993) y 700 (1994) millones de dólares anuales (Glasco, 1985).

El proceso tradicional de beneficiamiento del café que se venía realizando en México por vía húmeda, desde hace más de 100 años, sin cambios tecnológicos importantes, desde el inicio de

la década de los noventa ha estado bajo la presión de la nueva Ley de Aguas Nacionales y una normatividad ecológica más atenta de su aplicación.

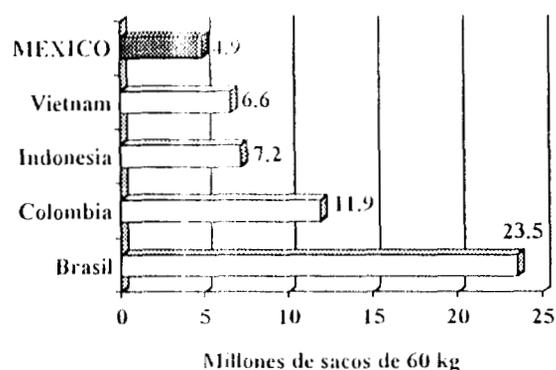


Figura 2.1. Producción mundial de café para la cosecha 1997-98. Fuente SAGAR 1999.

## 2.2. LA PULPA DE CAFÉ

El beneficio del café es una estrategia comercial que ha generado un creciente interés por la utilización de sus subproductos, como es la pulpa y el mucilago. Durante el proceso de beneficio húmedo del café se generan dos subproductos: la pulpa de café y el mucilago, de los cuales, la pulpa de café constituye el 39% del peso del fruto fresco (Zuluaga, 1989).

De acuerdo con los datos de la SAGAR 1997-98, en México se produjeron 4'800,900 sacos de 60 kilos de café pergamino seco. Esto equivale a 288,054 toneladas de café pergamino seco que a su vez provienen de 1'309,336 toneladas de café cereza (teniendo en cuenta que del 100% de café cereza, se obtiene el 22% de café pergamino, de acuerdo con Zuluaga, 1989).

Dado que la pulpa constituye el aproximadamente el 39% del peso del fruto fresco entonces se puede calcular una producción para el país durante la cosecha de 1997-98, del orden de 510,641 toneladas de pulpa fresca. Puesto que la pulpa fresca contiene un 81% de agua en peso (Tabla 2.1; Delgado, 1999), la cantidad de la pulpa producida en el México en base seca puede ser del orden de 148,085 toneladas.

Tabla 2.1. Composición química de la pulpa de café fresca

Parámetro	Elias, 1979	Delgado, 1999
Humedad (%)	76.7	81.4
Proteína seca (C)	23.3	18.6
Carbohidratos (% C)	1.5	8.3
Grasa en C <sub>18</sub> *6.25	2.1	12.7

nivel. La alta humedad de este material representa una de las mayores desventajas en su utilización, desde el punto de vista de transporte, manejo y procesamiento. La gran cantidad de pulpa producida en el país junto con su alto contenido de humedad, azúcares y proteínas (Elias, 1979, Zualaga, 1989), son condiciones que favorecen la descomposición extremadamente rápida y por consiguiente este subproducto de la roindación del café genera un gran problema de contaminación. Hasta hace 3 años la pulpa constituía un serio problema de contaminación de suelos y agua, ya que frecuentemente era arrojada al río o depositada en caminos vecinales de los beneficios. Durante muchos años se sabía perfectamente que el mejor aprovechamiento de la pulpa era su transformación en abono sin embargo era atractivo para los beneficios de café. La utilización más conocida, sobre todo en América Central, es como alimento para el ganado vacuno (Cabezas *et al.*, 1979, Vargas *et al.*, 1982; Arce y Pfeiffer, 1986), debido a que en ella se encuentran algunos nutrientes como azúcar, fibra, proteínas, hemicelulosa y celulosa (Elias, 1979, Zualaga, 1989) que son atractivos para los animales que la consuman, pero estas sustancias están estrechamente ligadas con la cafeína y los compuestos fenólicos, moléculas que pueden provocar efectos antifisiológicos y antinutricionales, respectivamente (Bressani, 1979, Vargas *et al.*, 1982). En la Tabla 2.2 se observa el porcentaje de algunos compuestos que se pueden encontrar en la pulpa de café. Estos compuestos son responsables de la toxicidad de la pulpa de café (Bressani, 1979).

Tabla 2.2. Contenido de cafeína y compuestos fenólicos en la pulpa de café

Compuesto	% en base seca
Cafeína	0.6-1.2% (Bressani, 1979)
	1.3% (Eliás, 1978)
	0.75% (Zuluaga, 1989)
	0.68% (Delgado, 1999)
Taninos	1.80-8.56% (Eliás, 1979)
	3.70% (Zuluaga, 1989)
Ácido clorogénico	0.18-3.16% (Bressani, 1979)
	2.6% (Eliás, 1979)
Ácido caféico o ácido 3-4-di-hidrocinámico	0.28-2.58 (Bressani, 1979)
	1.6% (Eliás, 1979)
Ácido tánico (digálico o galotánico)	2.3-5.56 (Bressani, 1979)

### 2.3. LA CAFEÍNA

La cafeína fue aislada a partir de bebidas preparadas, a principios del siglo XIX. Durante 1820, los investigadores identificaron el agente activo en el té y el chocolate y surgieron nombres como guanina o teína. En 1840, T. Martins y D. Bethemot mostraron independientemente que estos compuestos eran idénticos a la cafeína. La cafeína, inicialmente era llamada cofeína o cafeín, pero no fue hasta después de 1820, cuando se le dio el nombre por la cual la conocemos actualmente, "*cafeína*" (Gilbert, 1986).

La mayor parte del trabajo concerniente a la completa caracterización de la estructura molecular de la cafeína fue completado por el químico alemán Emil Fischer.

En 1958, la cafeína, fue reconocida por la American Food and Drug Administration (FDA) por ser Generally Recognized As Safe (GRAS).

La cafeína se ha encontrado en más de 70 especies de plantas. Las más conocidas son los cafetos (granos y hojas), cacao (haba), té (hojas) y mate (hojas). Es una purina que pertenece a la familia de los alcaloides y es considerada farmacológicamente como una de las moléculas

se consumida, en el mundo entero (Suzuki y Waller, 1988; James, 1991) El café, que se produce a partir del grano de café (*Coffea robusta* y *arabica*) conocido como el mayor consumidor de cafeína.

### Química de la cafeína

La cafeína es un alcaloide y pertenece a la familia de las purinas. También es conocida como 1,3,7-trimetil-xantina (Figura 2.2); 1,3,7-trimetil-2,6-dioxopurina o 3,7-dihidro-1,3,7-trimetil-2,6-dioxo-1,2,3,4-tetra-hidropiridina (Arnaud, 1987). Tiene una fórmula molecular de  $C_8H_{10}N_4O_2$ , un peso molecular de 194.2, compuesta de C 49.48%; H 5.19%; N 28.85%; O 16.48% y contiene dos anillos bicíclicos derivadas del sistema del anillo de la purina. En su forma pura, la cafeína es un polvo blanco con apariencia lanuda o de cristalina largos y sedosos. Sin aroma, pero tiene un fuerte olor o sabor amargo. La Figura 2.2 presenta los diferentes derivados desmetilados de la

Figura 2.1

Derivado	R <sub>1</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>7</sub>
1,7-Dimetilxantina ( <i>cafeína</i> )	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
1,7-Dimetilxantina ( <i>teofilina</i> )	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
1,7-Dimetilxantina ( <i>paraxantina</i> )	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
1,7-Dimetilxantina ( <i>teobromina</i> )	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
7-Dimetilxantina	CH <sub>3</sub>	H	H
5-Dimetilxantina	H	CH <sub>3</sub>	H
1,9-Dimetilxantina ( <i>heteroxantina</i> )	H	H	CH <sub>3</sub>
Xantina	H	H	H

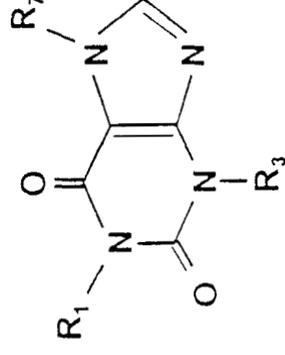


Figura 2.2. Representación química de cafeína y sus derivados desmetilados

Las principales características fisicoquímicas son las siguientes: punto de fusión 263°C; punto de ebullición 235°C; densidad 1.23 g/cm<sup>3</sup>; índice de refracción 1.52; solubilidad 2.2 g/100 ml en agua a 20°C; solubilidad a presión atmosférica 178°C, una longitud de onda máxima a 274 nm en una

solución acuosa de pH de 2 a 14, presenta un pH de 6.9, en una solución acuosa al 1%, un pKa aproximado de 14 y un pKb de 14.2.

La cafeína es soluble en agua y solventes orgánicos (Tabla 2.3). A altas temperaturas, la solubilidad de la cafeína en agua aumenta considerablemente.

Su concentración en el grano de café, varía de 0.9 a 2.4% en base seca, dependiendo de la variedad del grano.

Tabla 2.3. Solubilidad de la cafeína en diferentes solventes en función de la temperatura (Arnaud, 1987)

Solvente	Temperatura (°C)	Solubilidad (% p:v)	Solvente	Temperatura (°C)	Solubilidad (% p:v)
Agua	0	0.6	Etanol 95%	25	1.32
	15	1.0	Etanol puro	25	1.5-1.8
	20	1.46	Metanol	25	1.14
	25	2.13	Acetona	25-30	2.0-2.3
	30	2.8	Tolueno	25	0.58
	40	4.6	Benceno	18-25	0.9-1.0
	50	6.7-7.7	Tetracloruro de carbono	18	0.09
	60	9.7-12.9	Cloroformo	25	15-18.2
	70	13.5	Diclorometano	33	9.0
	75	19.2	Dicloroetileno	15-25	1.8
80	28.1	Acetato de etilo	18	0.7	
Hirviendo	66.7		Eter etílico	20	0.1-0.2

### Efectos biológicos de la cafeína

La acción fisiológica de la cafeína en las plantas, es probablemente defender a las plantas de insectos y hongos que se encuentran sobre la planta, ya que envenena a las cercas de las semillas en germinación (Friedman y Waller, 1983).

Aunque la cafeína es un alcaloide y presenta efectos farmacológico-fisiológicos en el hombre y en animales, los farmacólogos la clasifican como estimulante del sistema nervioso central (Clarke y Maerae, 1985).

En las actividades mentales, aumenta la sensación de bienestar y de vigilancia. También es útil junto con otras sustancias medicinales debido a que estimula y puede facilitar la acción de principios activos utilizados en el tratamiento del acné y otros problemas de la piel, problemas cardíacos, bronquiales, diuréticos, productos para adelgazar, etc. Pero se ha demostrado que una dosis letal de la cafeína en 10 g, el equivalente a 75-100 tazas de café ingeridas en un periodo de 30 minutos. Se considera que el consumo excesivo de cafeína (más de 1 g por día) puede provocar una intoxicación crónica, denominada *cafeinismo*. Esta enfermedad se caracteriza principalmente por vasodilatación o vasoconstricción de los vasos sanguíneos, aumento de secreciones ácidas de la mucosa gástrica, aumento de ácidos grasos libres y de la presión en el plasma sanguíneo, disturbios en el sueño, nerviosismo y aumento en la actividad, estremecimientos y palpitaciones cardíacas, diarreas, etc., (Starvic, 1988a) sin embargo la adaptación o el acostumbrarse al consumo de la cafeína puede disminuir estos efectos (Starvic, 1988b).

En las mujeres embarazadas, la cafeína, además de que se elimina con más dificultad (18 a 20 horas), puede presentar efectos sobre el desarrollo cerebral del feto, y por esta razón ha sido eliminada de los medicamentos para mujeres embarazadas (Arnaud, 1987).

En los animales, también se ha observado cierto efecto por el consumo de este alcaloide (Grossi, 1979). Por ejemplo, cuando se utiliza la pulpa de café en la alimentación de los pollos, hay aumento de la orina y pérdida de peso. En los pollos, la inclusión del 30% de cafeína en las porciones de alimentos, provoca una mortalidad elevada.

La cafeína no es la única metilxantina que provoca estos efectos biológicos. La teofilina y la teobromina pueden provocar efectos fisiológicos igualmente importantes, o comparables a los ocasionados por la cafeína (Stavric, 1988a,b). Arnaud (1987) menciona que la 1-metilxantina y la 3-metilxantina presentan espectros de actividades farmacológicas similares a los presentados por otras metilxantinas. La teobromina también ha sido relacionada con dolor de cabeza, insomnio, agitación, delirio moderado, temblor muscular y taquicardia en el hombre y la cafeína ha sido reportada por tener varias otras actividades incluyendo capacidad mutagénica, teratogénica y carcinogénica (Stavric, 1988b).

#### 2.4. CATABOLISMO DE LA CAFEÍNA

El catabolismo de la cafeína a sido estudiado principalmente en el hombre y en los mamíferos, donde se ha observado que sigue la vía de eliminación de los genobióticos. Pero también los microorganismos presentan la capacidad de degradar esta purina y de asimilar el nitrógeno liberado.

##### 2.4.1. Degradación por las plantas

En las plantas, la degradación de la cafeína se produce por una serie de desmetilaciones por las cuales se obtiene xantina, pasando por teobromina y la teofilina, después la 7-metilxantina y la 3-metilxantina. La xantina es rápidamente metabolizada por la vía clásica de degradación de las purinas teniendo como producto final a la urea y después  $\text{CO}_2$ , *Figura 2.3* (Suzuki *et al.*, 1989).

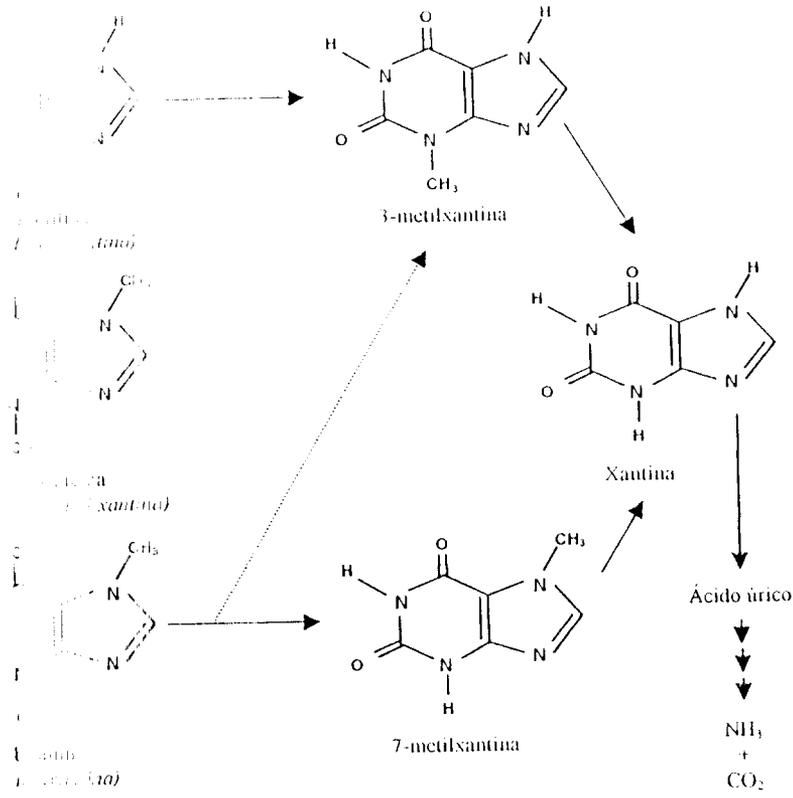


Fig. 2. Metabolismo de la cafeína en el café y en el té (Waller y Suzuki, 1989). La flecha punteada indica una transformación minoritaria.

La cafeína es sintetizada en el pericarpio, transportada al grano ahí se acumula durante el desarrollo del fruto. En el pericarpio, es donde inicia también la biodegradación. Además de su papel de reserva de nitrógeno, también juega un papel de pesticida y de agente de defensa (Baumann y Frischknecht, 1988).

En el caso del té, la cafeína tiene un tiempo de vida medio que no sobrepasa el mes, y se ha observado grandes variaciones de su contenido en función de las estaciones del año. En otoño, el contenido de cafeína sufre una notable disminución, sin embargo, en invierno el contenido de nitrógeno total

aumenta, lo cual indica que los alcaloides púricos, no tienen ninguna función de reserva de nitrógeno en esta temporada (Suzuki y Waller, 1989).

#### 2.4.2. Degradación por el hombre

Una de las vías de degradación de la cafeína más estudiada, es aquella que se realiza en el hombre. La cafeína es metabolizada a nivel del sistema enzimático, por los microsomas hepáticos, donde se han identificado más de 20 intermediarios de la degradación de la cafeína (Berthou *et al.*, 1988).

Las primeras etapas de degradación de la cafeína, son las etapas de N-desmetilación donde se activa un sistema de oxidación de los citocromos P-450 (Lelo *et al.*, 1989). Esta etapa produce esencialmente la paraxantina y luego la 1-metilxantina.

En una segunda fase de hidroxilación en posición 8 produce los derivados del ácido úrico, siempre por acción de diferentes isoformas del citocromo P-450. Estos compuestos son posteriormente excretados como tales.

Se puede notar la acción de la xantina oxidasa que permite una hidroxilación en la posición 8 de la 1-metilxantina para formar el ácido 1-metilúrico, y también podría formar el ácido 1,7-dimetilúrico a partir de la paraxantina, *Figura 2-4* (Arnaud, 1987).

La transformación de la cafeína es idéntica a la de una sustancia xenobiótica la cual el organismo puede también eliminar. Por eso, el organismo reconocerá a esta molécula como más hidrofílica, primeramente removiendo los grupos metilos y enseguida por oxidación, produciendo los derivados del ácido úrico.

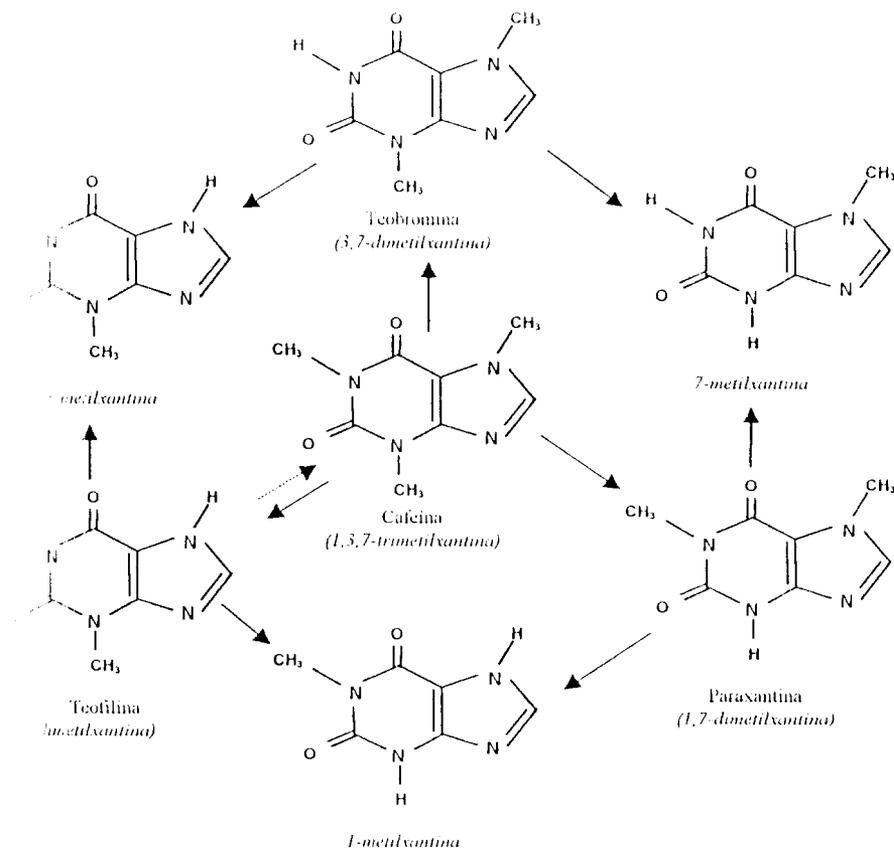


Figura 2.4. Metabolismo de la cafeína en el hombre (Arnaud, 1987). La flecha puntada indica una transformación minoritaria.

### 2.4.3. Degradación por las bacterias

Los estudios han sido realizados sobre ciertas cepas de bacterias capaces de utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno. Las cepas estudiadas por Blecher y Lingens (1977) y posteriormente por Hohnloser *et al.*, (1980) se inhibe a una concentración de cafeína de  $5.5 \text{ g L}^{-1}$ , mientras que la cepa aislada por Gluck y Lingens (1987) puede desarrollarse hasta en concentraciones de  $20 \text{ g L}^{-1}$  de cafeína.

Según Woolfolk (1975); Blecher y Lingens (1977) y Hohnloser *et al.*, (1980), las primeras etapas de la degradación de la cafeína corresponden a desmetilaciones sucesivas dando lugar a la xantina y a la liberación de grupos metilo.

Gluck y Lingens (1987) demostraron que para *Pseudomonas putida* la primera etapa de degradación se realiza principalmente por la vía de la teobromina y posteriormente se obtiene la 7-metilxantina. Luego el metabolismo de la xantina sigue la vía clásica de degradación de las purinas, la cual conduce a la formación de urea.

Los intermediarios del metabolismo de la cafeína en *P. putida* han sido identificados por Blecher y Lingens (1977) utilizando un medio con cafeína, metilxantinas o xantina (Figura 2.5), resultados que fueron confirmados posteriormente por diferentes autores (Hohnloser *et al.*, 1980; Gluck y Lingens, 1987; Asano *et al.*, 1993).

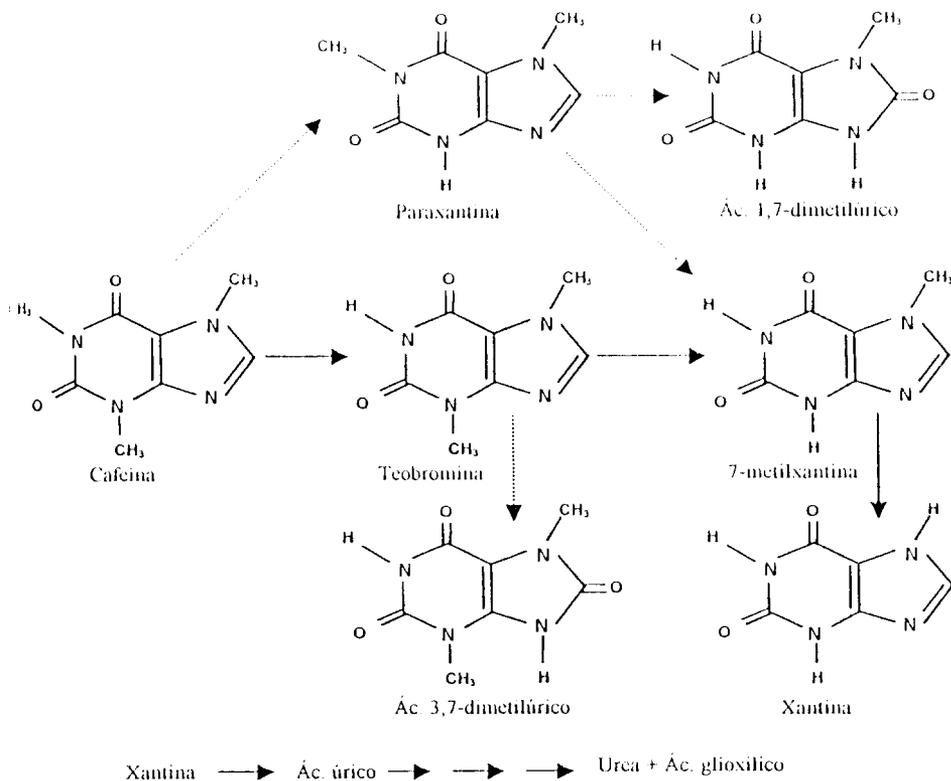


Figura 2.5. Vía de degradación de la cafeína en *Pseudomonas putida* (Blecher y Lingens, 1977). Las flechas punteadas corresponden a las transformaciones minoritarias.

**2.4.4. Degradación por los hongos filamentosos**

La bioquímica del catabolismo de la cafeína en los hongos filamentosos no ha sido muy estudiada. Sin embargo, algunos estudios han sido enfocados sobre la decafeinización de la pulpa de café utilizando la vía biológica y principalmente sobre la selección de cepas de hongos capaces de eliminar este alcaloide contenido en la pulpa.

Los hongos filamentosos más estudiados por su capacidad de utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno, pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, principalmente. Kurtman y Schwimmer (1971) aislaron dos cepas, una de *Stemphylium* y otra de *Penicillium roqueforti*

capaces de degradar la cafeína, la teobromina y la xantina. La cepa de *P. roqueforti* mostró ser la más apta que la cepa de *Stemphylium* para degradar la cafeína. La cafeína puede ser utilizada como única fuente de nitrógeno por los hongos que la degradan, pero la posibilidad de utilizarla simultáneamente como fuente de carbono y de nitrógeno no ha sido mencionada (Kurtzmann y Shwimmer, 1971; Shwimmer *et al.*, 1971). Sin embargo, una cepa de *Penicillium crustosum* degrada la cafeína de una infusión de café en ausencia de fuentes exógenas de carbono, pero más lentamente que en presencia de sacarosa o de glucosa (Schwimmer y Kurtzman, 1972).

Schwimmer *et al.*, (1971) determinaron el crecimiento óptimo para la cepa de *P. roqueforti* utilizando una concentración inicial de 2 g L<sup>-1</sup> de cafeína. Pero esta misma cepa no puede desarrollarse a concentraciones de 20 g L<sup>-1</sup> de cafeína (Kurtzmann y Shwimmer, 1971). Las velocidades máximas de degradación de la cafeína reportadas son de 11.7 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para la cepa de *P. crustosum* (Schwimmer y Kurtzman, 1972) y 51.6 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para la cepa de *P. roqueforti* (Kurtzmann y Shwimmer, 1971), ambas cultivadas en un medio a base de cafeína con una concentración inicial de 2 g L<sup>-1</sup> y sacarosa 30 g L<sup>-1</sup>.

Las primeras etapas implicadas en la degradación de la cafeína por hongos filamentosos implican reacciones de desmetilación, como sucede en el caso de las bacterias. Sin embargo, la secuencia de desmetilación es diferente.

El primer producto de degradación de la cafeína es la teofilina en *P. roqueforti* (Shwimmer *et al.* 1971), y en *A. tamaritii* (Denis, 1996; Hakil *et al.*, 1998). La teofilina es posteriormente degradada a 3-metilxantina (Denis, 1996; Hakil *et al.*, 1998) y luego en xantina (Denis, 1996). La degradación de la xantina a sido estudiada en *A. nidulans* (Scazzochio y Darlington, 1968), quienes indican que la xantina es transformada a ácido úrico (Figura 2.6).

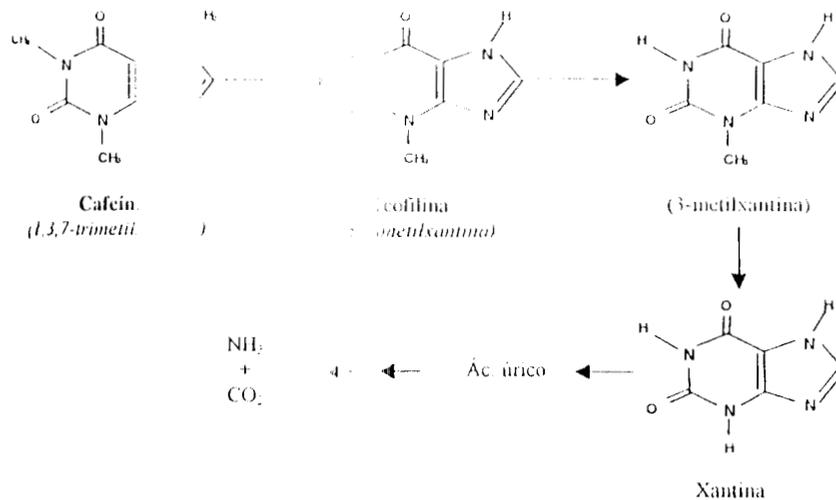


Figura 2.6. Degradación de la cafeína por los hongos filamentosos (Scazzocho y Darlington, 1968; Hakil *et al.*, 1998).

Por otra parte, la degradación de la cafeína de la pulpa de café se ha realizado exitosamente usando la fermentación en medio sólido con hongos filamentosos (Roussos *et al.*, 1994; Gaimé-Perraud *et al.*, 1995). Roussos *et al.* (1994) reportan que la adición de nitrógeno mineral (urea, 1.75 g L<sup>-1</sup> y sulfato de amonio, 3.75 g L<sup>-1</sup>) inhibe la degradación de la cafeína cuando se utiliza *P. commune* sobre pulpa de café en fermentación en medio sólido. Sin embargo, Denis (1996) reporta que la degradación de la cafeína por *Penicillium* V33A25, es acelerada cuando se añade al medio con cafeína un anhidruro de amonio en una concentración de 0.136 g L<sup>-1</sup>. Si se añade a un medio con cafeína un anhidruro de amonio no se acelera la degradación. Denis (1996) realizó un estudio físico y bioquímico de la degradación de la cafeína por dos hongos *Aspergillus* V12A y *Penicillium* V33A25. Demuestra que la cepa de *Penicillium* V33A25, resiste mayores concentraciones de cafeína (entre 20 y 50 g L<sup>-1</sup>) que la cepa de *Aspergillus* V12A (entre 5 y a 10 g L<sup>-1</sup>) y a una concentración de 5 g L<sup>-1</sup> de cafeína inicial, obtiene una velocidad

maxima degradación de  $85 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Además observa que con la adición de  $0.136 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio, la degradación de la cafeína se ve acelerada en *Penicillium* V33A25. También demuestra que el sistema enzimático de *Aspergillus* V12A25 para la degradación de la cafeína, es intracelular e inducible y que la actividad cafeín-desmetilasa desaparece rápidamente una vez que la cafeína del medio a sido consumida totalmente.

En 1998, Halil *et al.* hacen un análisis de los intermediarios de la degradación de la cafeína por hongos filamentosos. Señalan que aunque las diferentes cepas evaluadas, no tiene la misma capacidad de degradación de la cafeína, si presentan los mismos productos de degradación los cuales son teofilina y 3 metilxantina y sugiriendo que es debido a dos desmetilaciones sucesivas. Concluyen que los primeros pasos de degradación de la cafeína en los hongos filamentosos consisten de reacciones de desmetilación, la cuál puede darse en la posición 1 y 7.

Si una fuente de nitrógeno simple (sulfato de amonio, urea) es adicionada a un medio que contenga cafeína, esta fuente de nitrógeno simple será usada primero permitiendo el crecimiento del hongo y si una vez terminada la fuente de nitrógeno simple se encuentra presente sacaroza, la cafeína será utilizada como fuente de nitrógeno. (Hakil *et al.*, 1999)

## 2.5. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

El término "fenólico" es usado para definir sustancias que poseen uno o más grupos hidroxilo (OH) enlazados a un anillo aromático. El nombre deriva de la sustancia fenol. Los compuestos que tienen varios sustituyentes hidroxifenólicos frecuentemente se les denomina como "polifenoles" (Waterman y Mole, 1994).

Los compuestos fenólicos también llamados polifenoles, están presentes en todo el reino vegetal y comprenden un grupo heterogéneo de sustancias, algunas con estructuras químicas relativamente simples, de las cuales las más importantes son las antocianinas (pigmento rojo y azul de las flores y las frutas), los flavonoides y sus derivados (pigmentos amarillos); también se pueden considerar a los ácido fenólicos, cuya presencia en las plantas es conocida, así como otras moléculas más complejas como los taninos y la lignina (Ribereau-Gayon, 1968).

## 2.6. LOS TANINOS

Los taninos, son compuestos fenólicos, solubles en agua y están presentes en frutas y vegetales. Tienen la característica de ser compuestos oligoméricos con múltiples unidades estructurales con grupos fenólicos libres, tiene un peso molecular entre 500 y 20000, algunas estructuras de alto peso molecular no son solubles en agua, tiene la característica de enlazar proteínas y formar complejos tanino-proteína que pueden ser solubles o insolubles (Haslam, 1989).

En las plantas, los taninos pueden estar en las vacuolas o incorporados a la pared celular. En muchas especies de plantas los taninos se acumulan y no participan en el metabolismo, las concentraciones acumuladas pueden ser muy altas. Dicha acumulación al parecer se da para proteger las partes vulnerables de las plantas de ataques microbianos, mediante la inactivación de enzimas extracelulares de bacterias u hongos y previene la germinación y crecimiento de esporas (White, 1957). Los taninos también juegan un papel importante en la protección de las plantas contra los herbívoros.

### 2.6.1. Clasificación de los taninos

Usar la palabra tanino en forma generalizada es erróneo, debido a que no sólo se trata de un único compuesto. En el trabajo presentado por Lekha y Lonsane (1997), se sugiere que la terminología correcta debe apegarse a la clasificación de los compuestos fenólicos en cuestión, los cuales se agrupan en dos grandes grupos: los taninos hidrolizables y los condensados.

**Taninos hidrolizables (TH).** Son moléculas con una poliol (generalmente *D*-glucosa) como núcleo central. Los grupos hidroxilo de este carbohidrato se encuentran parcial o totalmente esterificados con grupos fenólicos como el ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos), Kumar y Singh (1984) y Scalbert (1991).

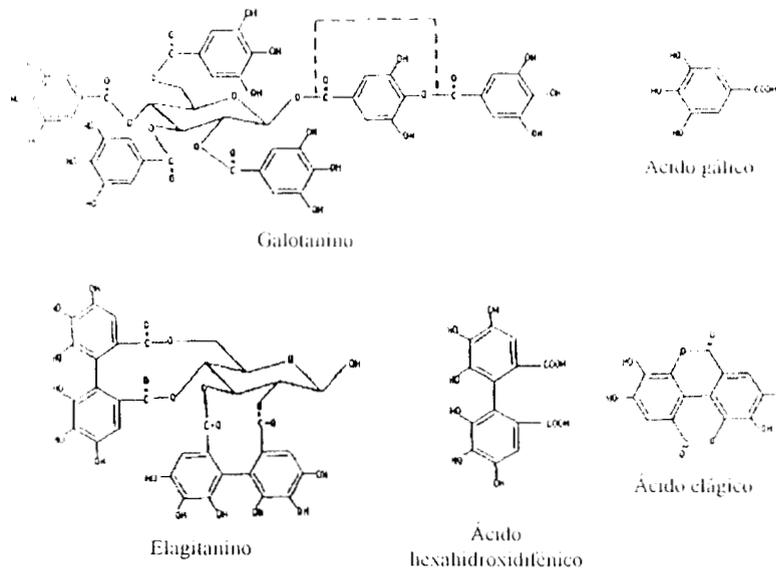


Figura 2.7. Ejemplos de taninos hidrolizables

El más común de los taninos es el ácido tánico, que es un galotanino, formado por ésteres del ácido gálico y la glucosa, el cual contiene cinco moléculas de ácido gálico unidos directamente a la molécula de glucosa (pentagalatoilo de glucosa), a estos ácidos gálicos centrales se esterifican otras moléculas de ácido gálico, para componer el ácido tánico.

Algunos autores (Haslam, 1989; Hemingway y Karchesy, 1989) proponen dos clases adicionales de taninos hidrolizables: taragalotaninos (ácido gálico y ácido quínico como molécula central) y cafetaninos (ácido cafeico y ácido quínico)

Los THs son hidrolizables por ácidos o bases débiles para producir carbohidratos y ácidos fenólicos. También son hidrolizados por calor o con enzimas (tanasa)

**Taninos condensados (proantocianidinas).** Los taninos condensados se encuentran distribuidos más ampliamente que los THs. Son oligómeros o polímeros de unidades flavonoides (flavon-3-ol) unido con un enlace C-C, el cual no es susceptible a ruptura por hidrólisis (Nishira y Joslyn, 1968; Lekha y Lonsane, 1997; García-Peña *et al.*, 1999) Goodwin

Mercer (1983) reportaron que los taninos condensados no poseen residuos de azúcares, simplemente son polímeros del flavon-3-ol o del flavon-3,4-diol (Lekha y Lonsane 1997)

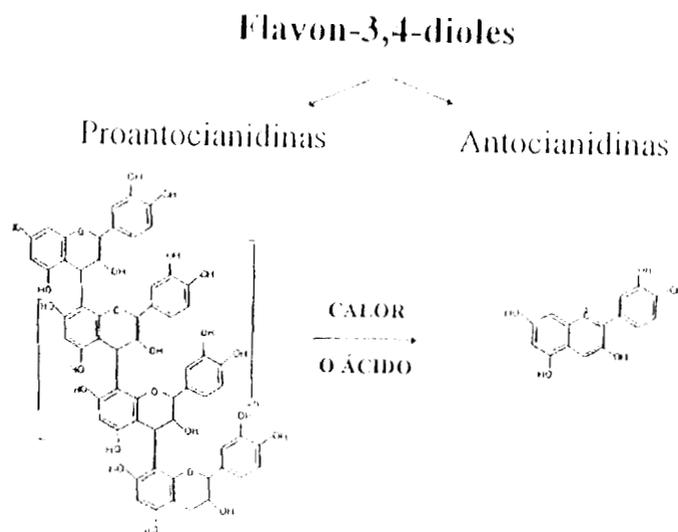


Figura 2.8. Ejemplos de taninos condensados (proantocianidinas)

Las proantocianidinas no son hidrolizables por ácidos o bases débiles, como los son los THs. Waterman y Mole (1994) proponen un tercer grupo de taninos, *los florotaninos*, los cuales se encuentran en algas cafés y se componen de la polimerización de floroglucinol o unidades de floroglucinol, principalmente. Los monómeros de floroglucinol están unidos a través de una serie de enlaces C-O o C-C, para formar un polímero

**2.6.2. Efectos tóxicos y antinutricionales de los taninos**

Las propiedades de los taninos son comúnmente el resultado de su habilidad para formar complejos con las proteínas. El efecto de los taninos presentes en vegetales se puede agrupar de la siguiente manera: inhibición enzimática, inhibición microbiana, efecto de los taninos en forrajes y efecto de los taninos sobre organismos superiores.

Los taninos participan en mecanismos de defensa en las plantas contra patógenos, herbívoros y condiciones ambientales hostiles. Los taninos inducen una respuesta negativa cuando se consumen, estos efectos pueden ser instantáneos como astringencia, amargura o sabor indeseable (Van Soest, 1994).

También afectan negativamente la ingesta de alimentos de los animales, la digestibilidad de los alimentos y la eficiencia de producción. Estos efectos varían dependiendo del contenido y tipo de taninos ingeridos y a la tolerancia de los animales que los ingieren, lo cual va a depender de las características de cada tracto digestivo, conducta de alimentación, tamaño del animal y mecanismos de detoxificación (Reed, 1995).

El impacto negativo de los taninos sobre la nutrición se atribuye a su capacidad para formar complejos con numerosos tipos de moléculas, incluyendo pero no limitado a carbohidratos, proteínas, membranas celulares de bacterias, enzimas involucradas en la digestión de proteínas y carbohidratos (Waterman y Mole, 1994).

Las interacciones tanino-proteína son específicas y dependen de la estructura tanto de la proteína como del tanino. Las características de las proteínas que favorecen la fuerte interacción son: moléculas de gran tamaño, estructura abierta, flexible y rica en prolina. Las características de los taninos que favorecen esta interacción son: alto peso molecular y gran movilidad conformacional (Murray *et al.*, 1994; Luck *et al.*, 1994).

Como se ha mencionado, la característica más importante de los taninos es probablemente su capacidad de ligar proteínas, haciéndolas inaccesibles al organismo, también puede actuar como inhibidores enzimáticos. La proteína al unirse con los taninos puede ser protegida de la hidrólisis proteolítica enzimática en el rumen (Van Soest, 1994). Estos compuestos poliméricos pueden, por lo tanto interferir con el comportamiento de los animales al disminuir la disponibilidad biológica de las proteínas consumida, o a través de un proceso de inactivación de la acción enzimática, o como una fuente de componentes fenólicos libres (Bressani, 1979)

Chang *et al.*, (1964) y Vohra *et al.*, (1966), demostraron que la adición de ácido tánico a dietas para pollos reduce su crecimiento, su consumo de alimento y su eficiencia de alimentación.

no efecto negativo de la presencia de taninos en la dieta de los animales, que se reporta, es que se nota una disminución de la digestibilidad de los productos animales. Se da un deterioro del sabor y olor de la carne y un color rojo oscuro en carnes nuevas (Kumar y Singh, 1984).

### 2.6.3. Degradación de los taninos

Se han reportado varios microorganismos (bacterias, levaduras y hongos), con la capacidad de degradar taninos.

Deschamps *et al.*, (1983) aislaron bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, y *Streptococcus*, las cuales son capaces de degradar ácido tánico.

Aoki *et al.*, (1976, 1979) aislaron bacterias y levaduras del suelo para la degradación de ácido tánico. Una cepa del género *Streptococcus* es capaz y degrada el ácido tánico mediante la producción de enzima (tanasa) extracelularmente.

Entre los taninos hidrolizables se encuentran los degradados por un número relativamente grande

de microorganismos. Únicamente la *Penicillium* es capaz de crecer sobre taninos condensados y subunidades, utilizando estos compuestos como única fuente de carbono (Bajpai y Patil, 1996; Starkey, 1969; Grand, 1976). Hongos de otros dos géneros, también pueden crecer sobre taninos que contengan desde 2 hasta 20% (p/v) de taninos hidrolizables (Bajpai y Patil, 1996; Lagemaat *et al.*, 1999).

### 2.6.4. La tanasa

La enzima tanasa es una hidrolasa (amilasa) (amil-hidrolasa, TAH, EC, 3.1.1.20) cataliza la hidrólisis de enlace éster y depende de la presencia de calcio (Bajpai *et al.*, 1994) de los taninos hidrolizables como el ácido tánico (Figura 2.9) para producir ácido galúlico (Dykerhoff y Ambruster, 1933).

Esta enzima es producida por hongos filamentosos, principalmente por especies del género *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* (Iibuchi *et al.*, 1967; Rajakumar y Nandy, 1983; Kawakubo *et al.*, 1991; Leong y Leong, 1994; Bajpai y Patil, 1996; García-Peña *et al.*, 1999; Van de Lagemaat *et al.*, 1999), así como también la producen bacterias (Deschamps *et al.*, 1983; Skene y Crooker, 1994) y levaduras (Aoki *et al.*, 1976); además, esta actividad

esterasa ha sido detectada en diversos vegetales (Sourlangas, 1947, Madhavakrishna *et al.*, 1960). La tanasa se aplica comercialmente en la manufactura de algunas bebidas y alimentos, en la industria químico-farmacéutica, cervecera y de alimentación animal.

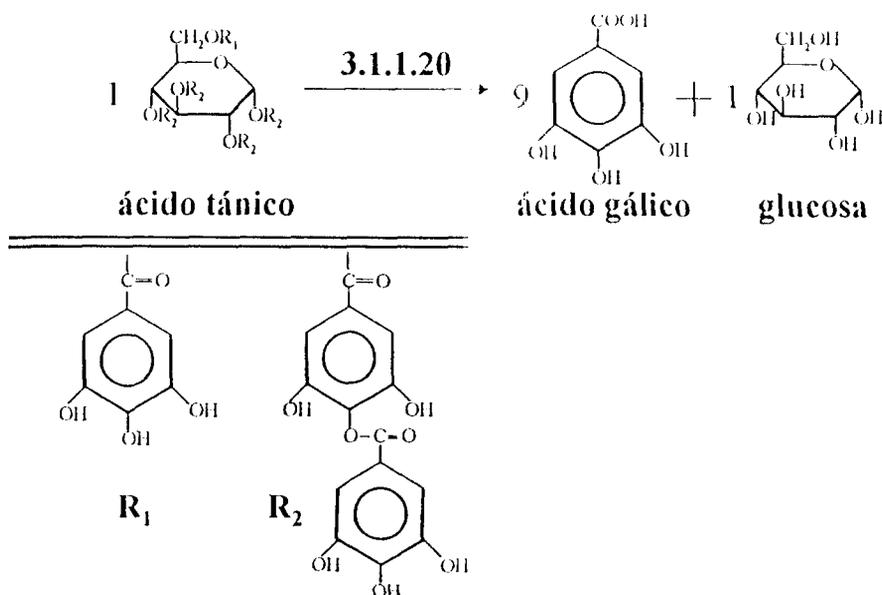


Figura 2.9. En la reacción de hidrólisis de una mol de ácido tánico (tanino hidrolizable) se libera una mol de glucosa y de 7 a 9 moles de ácido gálico, dependiendo del grado de sustitución. R<sub>1</sub>, galoil y R<sub>2</sub>, digaloil (Aguilar y Gutiérrez, 1999).

El ácido clorogénico, un depsido del ácido caféico y ácido quínico, es resistente a la acción de la tanasa, a pesar que el ácido caféico contiene dos grupos fenólicos OH, esto se atribuye a la presencia de un doble enlace sobre la cadena del grupo COOH esterificado (Lekha y Lonsane, 1997). Sin embargo, Yamada y Tanaka (1972), en una patente para el uso de la tanasa en la fabricación de vinos, reportan que la tanasa hidroliza el ácido clorogénico en el jugo de uva, produciendo así ácido caféico y ácido quínico. También se ha reportado que la tanasa hidroliza el galato de epicatequina y el 3-galato de epigalocatequina, los cuales son taninos condensados que se encuentran en el té (Nierenstein, 1936, Bradfield y Penny, 1948).

### 3.1.1. HONGOS FILAMENTOSOS:

Los hongos filamentosos eucariotas crecen en forma de filamentos, las que presentan en sus extremos un crecimiento por celulosa o quitina como componentes principales. Normalmente se les denominan hifas y crecen por crecimiento apical, y se clasifican por el tipo de pared de hifas que se denomina micelio. Los hongos filamentosos son, en su mayoría, micófitos que crecen a temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 30°C (Dracon *et al.* 1981).

Los hongos filamentosos son heterótrofos, es decir, requieren de energía y de carbono para su crecimiento. Debido a la rigida pared celular, los hongos filamentosos obtienen mediante la degradación de los nutrientes presentes en el medio (Dracon 1993).

Las hifas individuales en el caso de los hongos filamentosos, pueden ser septadas o aseptadas. Los hongos filamentosos se caracterizan por ser organismos que los nutrientes se degradan en hifas, dando lugar a la formación de micelio (Berry 1975).

Los hongos filamentosos, ácido acético, con un rango de 20 a 30°C (Smith y

*et al.* 1981).  
 Los hongos filamentosos son heterótrofos, es decir, requieren de energía y de carbono para su crecimiento. Debido a la rigida pared celular, los hongos filamentosos obtienen mediante la degradación de los nutrientes presentes en el medio (Dracon 1993).

### 3.1.2. Regulación genética del metabolismo de los hongos en los hongos:

El metabolismo está presente como componentes de casi todos los componentes de los hongos filamentosos a la estructura y función de los hongos filamentosos vivos (Vesilic y Mazzocchio, 1985). Los hongos filamentosos pueden utilizar una gran variedad de compuestos como fuente de energía y expresar una sobre demanda de enzimas catabólicas de diferentes tipos (Cavalli y *et al.*, 1993).

Los compuestos nitrogenados (amoni, glutamina y glutamato) son usados preferencialmente como fuente de nitrógeno por los hongos. Sin embargo, cuando esta fuente primaria de nitrógeno no es disponible o están presentes en concentraciones suficientemente bajas para el crecimiento, otras fuentes de nitrógeno difíceles pueden ser utilizadas como por ejemplo: urea, nitrato, purinas, aminoácidos y proteínas (Lynch y Davis, 1996). La utilización de diferentes fuentes secundarias de nitrógeno es altamente regulada y casi

siempre requiere de la síntesis de un grupo de enzimas catabólicas específicas y permeasas. Si no de otra forma estarían sujetas a represión catabólica por nitrógeno (Marzluf, 1993).

En la década pasada, se realizaron varios avances con el fin de entender mejor el circuito regulatorio en varios hongos los cuales tienen la característica de usar preferencialmente fuentes de nitrógeno primarias cuando están disponibles pero también permite la utilización selectiva de diferentes fuentes de nitrógeno secundarias cuando es necesario (Marzluf, 1997).

La expresión selectiva de los genes dentro de una vía catabólica particular de nitrógeno. También requiere de inducción específica, mediada por proteínas regulatorias de vías específicas.

### 2.7.2. El género *Penicillium*

El género *Penicillium*, forma parte de los hongos más utilizados en la biotecnología para la preparación de productos alimenticios (quesos, productos orientales), producción de metabolitos secundarios (antibióticos, aromas) o producción de enzimas (pectinasas, celulasas). *Penicillium*, pertenece a la familia de los Eurotiaceae (Alexopoulos y Mims, 1979) y es clasificado taxonómicamente de la siguiente manera:

Clase: ASCOMYCETES

Subclase: PLECTOMYCETIDAE

Orden: EUROTIALES

Familia: EUROTIACEAE

El género *Penicillium*, se caracteriza por tener un micelio septado y ramificado. Los conidióforos pueden ser septados o no septados, y ramificados hasta tres veces, simétricamente o asimétricamente. La base no ramificada del conidióforo se llama estipe. Los conidioforos tienen en los extremos las fiálides, de las cuales se van separando sucesivamente los conidios. de modo que la longitud de la célula permanece sensiblemente constante (Smith, 1962)

3. Usos biotecnológicos de *Penicillium*

En los últimos años que los hongos del género *Penicillium*, se han utilizado para la fabricación de productos alimentarios. Los numerosos estudios que se han realizado sobre diferentes tipos de microorganismos han permitido ampliar los campos de aplicación en las áreas agroalimentarias, farmacológicas y ecológicas.

*Penicillium*, se puede utilizar en la producción de quesos y carnes, ácido orgánicos como el ácido glucónico y el ácido kojico en la producción de enzimas: dextranasas, glucoxidasas, amilasas, celulasas, ribonucleasas, amilamerasas, tanninas, cafein-desmetilasa; en la producción de antibióticos como la penicilina, el amudol, la griseofulvina o producción de analgésicos, esteroides, vitaminas o inmunosupresores (Smith, 1975; Jong y Birmingham, 1992; Smith, 1991; Denis, 1993; Sekhi y Lonsari, 1997)

2.8. COMPOSTOII

Una revisión bibliográfica nos ha permitido conocer la información concerniente a la cafeína. Los taninos de la cafeína es una molécula producida de forma natural por más de 70 especies de plantas, entre ellas que se encuentran en los cafetos y las hojas de té. También permitió conocer las características físico-químicas y sus efectos farmacológicos y su toxicidad. Así como el mecanismo de degradación por parte tanto en las plantas, como en el hombre, las bacterias y hongos, lo cual ha sido resultado de una gran cantidad de estudios.

Por otro lado, el análisis nos permitió conocer las características de los compuestos fenólicos, principalmente de los taninos. Su estructura química, sus efectos antinutricionales, y los estudios realizados entonces a la degradación de estos compuestos, principalmente.

Tanto la cafeína como los taninos se encuentran en la pulpa de café, que como se pudo observar, en México hay una gran generación de este subproducto de la agroindustria del café, lo cual ha generado serios problemas de contaminación y debido a las nuevas reglamentaciones ecológicas de México es urgente aplicar soluciones a este problema.

Una de las soluciones, más interesantes ha sido emplear este subproducto como alimentación animal, pero como pudimos observar, la pulpa de café contiene tanto cafeína como taninos los cuales producen efectos antinutricionales y antifisiológicos en los animales que consuman este subproducto.

Es interesante saber que hay un gran avance en el estudio de eliminación de estas dos moléculas, tanto en fermentación líquida como en fermentación sólida, al grado de que se ha podido encontrar algunas de las enzimas involucradas en la degradación de alguna estas moléculas.

Pero hasta el momento, no se ha realizado ningún estudio para buscar o seleccionar algún microorganismo que pueda utilizar tanto la cafeína, como el ácido tánico simultáneamente; lo cual puede hacer más atractivo el proceso de detoxificación de la pulpa de café, ya que al encontrar un microorganismo que tenga el o los sistemas enzimáticos para producir las enzimas necesarias para degradar estos dos compuestos, reduciría significativamente los tiempos y costos del proceso. Por lo cual se plantea el presente trabajo de investigación.

## *CAPÍTULO 3*

---

---

### *OBJETIVOS*

---

## OBJETIVOS

---

### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones de fermentación líquida para la degradación de cafeína en presencia de ácido tánico, empleando un hongo filamentoso.

### 3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 3.2.1. Seleccionar cepas de hongos filamentosos con capacidad de crecer sobre un sustrato sólido preparado a partir de infusión de pulpa de café.
- 3.2.2. Seleccionar cepas de hongos filamentosos con capacidad de degradar la cafeína.
- 3.2.3. Evaluar métodos de conservación de cepas a corto y largo plazo.
- 3.2.4. Estudiar, el efecto de fuentes de nitrógeno y carbono de fácil asimilación, sobre la degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico.
- 3.2.5. Determinar, el grado de asociación de la producción de la enzima Cafeín-desmetilasa, con el crecimiento.

*CAPÍTULO 4*

---

---

*MATERIALES*  
*Y*  
*MÉTODOS*

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el capítulo de Materiales y Métodos se presentan los microorganismos, los medios de cultivo y las técnicas utilizadas para seleccionar y evaluar el hongo filamentosos con la mejor capacidad de para degradar cafeína en presencia de ácido tánico, además la estrategia experimental que se siguió para cumplir con los objetivos propuestos.

### 4.1. MICROORGANISMOS

Las cepas utilizadas pertenecen a la colección IRD-UAM (Roussos *et al.*, 1995) y a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). Las cepas de la colección IRD-UAM fueron aisladas a partir de muestras tomadas sobre los sitios de producción de café en Xalapa, Veracruz. Las cepas empleadas en el presente estudio tienen la característica de ser consideradas como cepas GRAS (Generally Recognized As Safe), es decir, que bajo ciertas condiciones, no producen toxinas y los productos de fermentación resultantes pueden utilizarse como alimento. Por ejemplo, cuando una mezcla de frijol de soya y trigo es inoculada con *Aspergillus oryzae* y posteriormente se incuba bajo ciertas condiciones, al final del proceso se obtendrá la salsa de soya. (Jong y Birmingham, 1992), como el producto final de la fermentación es de consumo humano, entonces se considera que *Aspergillus oryzae* es un microorganismo GRAS, para la elaboración de la salsa de soya.

En la *Tabla 4.1* se presentan las cepas utilizadas y las claves que se usaron para identificarlas.

**Tabla 4.1.** Clave de identificación de los hongos filamentosos usados en este estudio

Clave de identificación	Nombre del hongo	Procedencia
U-2095	<i>Aspergillus niger</i>	CECT
U-2094	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CECT
U-2088	<i>Aspergillus glaucus</i>	CECT
U-2339	<i>Aspergillus niger</i>	IRD-UAM
U-2340	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CECT
U-2774	<i>Aspergillus fumigatus</i>	CECT
U-2267	<i>Aspergillus niger</i>	CECT
U-2339	<i>Aspergillus niger</i>	IRD-UAM
U-2339	<i>Aspergillus niger</i>	IRD-UAM

#### 4.1. CONSERVACIÓN DE LAS CÉLULAS

Para la conservación de las cepas se utilizaron medios de cultivo en frascos inclinados con medio de pulpa de café-agar, *medio Aa* (Roussos *et al.*, 1983). Se prepararon frascos de 250 mL con capacidad de 100 mL y se agregaron 7 mL de *medio Aa* (pulpa de café con agar) a cada frasco. La inoculación se hizo una vez que el medio estuvo a temperatura ambiente, por lo que se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se dejó solidificar en posición inclinada. Los frascos se incubaron a 30°C durante 4 días (hongos de crecimiento, *Rhizopus*) y 7 días (hongos de mantenimiento; *Aspergillus*, *Penicillium*), para finalmente mantenerlos en refrigeración (4°C).

### 4.3. COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los diferentes medios de cultivo utilizados a lo largo de este trabajo se resumen en las *Tablas 4.2 y 4.3*.

El medio base para los medios presentados en la *Tabla 4.2*, es el siguiente ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.30;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.16;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.30;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.30. Además, presentan una concentración inicial de cafeína de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ . Todos los medios que se requiere solidificar se les adiciona agar,  $20 \text{ g L}^{-1}$ , a excepción del *medio C* que se le adicionan  $23 \text{ g L}^{-1}$ , debido a que el ácido tánico modifica el punto de gelificación del agar y es necesario agregarle más agar.

**Tabla 4.2.** Medios de cultivos empleados para evaluar el crecimiento radial y longitudinal (*medio Aa*), la capacidad de degradación de cafeína (*medio Ba*) y medio de conservación para evaluar el efecto de las Fuentes de Nitrógeno y Carbono (*medio C*)

Componente	Medio ( $\text{g L}^{-1}$ )				
	Aa	A	Ba	B	C
Sacarosa	---	---	2.0	2.0	---
Café molido	---	---	40.0	40.0	40.0
Pulpa de café fresca	427.7	427.7	---	---	---
Acido Tánico*	---	---	---	---	10

\*El ácido tánico se disuelve en una porción de agua y se agrega por filtración al medio (esterilizado) y posteriormente se ajusta el pH.

Medio de cultivo Aa: medio de infusión pulpa de café-agar.

A: medio de infusión pulpa de café.

Ba: medio de infusión de café-sacarosa-agar.

B: medio de infusión de café-sacarosa.

C: medio de infusión de café-ácido tánico-agar.

La *Tabla 4.3*, muestra los cinco diferentes medios de cultivo empleados para evaluar el efecto de las fuentes de nitrógeno y carbono sobre la degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico, para los cuales el medio basal fue el siguiente ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.30;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.16;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.30;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.30; y en  $\text{mg L}^{-1}$ :  $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 18;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 12;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 9. Los medios de cultivo tiene una relación de C/N de 50. Además de que se

on micronutrientes esenciales para la producción de la enzima tannin-acetil-hidrolasa (Hatanaka, Leung y Oishi, 1995). El medio H, la fuente de nitrógeno y el 10% restante de nitrógeno fue proporcionado por sustrato. El medio F, el ácido tánico aportó el 90% del carbono y la fuente aportó el 10% del carbono.

Tabla 4.3. Medios de cultivo para evaluar la degradación de cateína en presencia de ácido tánico y Fuente de Carbono, simples. Medio (g L<sup>-1</sup>)

Componente	F	G	H
Cateína	---	0.899	---
Sustrato de amoníaco	0.295	1.36	0.137
Ácido tánico*	4	25	21.965
Sacarosa	---	34.2	3.413

\*El ácido tánico se agrega por filtración al medio de agua y se agrega por filtración al medio hasta el pH.

Medio de cultivo: F: Fuente de nitrógeno y ácido tánico; G: Fuente de nitrógeno y sacarosa; H: Fuente de nitrógeno, ácido tánico y sacarosa.

#### 4.1. Medio de cultivo para agar (medio Aa)

4.1.1. Medio de cultivo para agar: Se prepararon perfectamente durante 5 minutos con 40 g de agar por litro de agua y posteriormente se llevaron a ebullición por 30 minutos cuidadosamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de haber puesto en ebullición la mezcla, se filtró a través de un filtro de serigrafía No. 1. El filtrado se recuperó y se calentó durante 5 minutos a 5000 rpm para recuperar el sobrenadante. Las sales minerales se agregaron al medio de cultivo y se calentó hasta su completa disolución. El volumen se ajustó a 1 litro. El pH se ajustó a 5.0. El medio H.

Una vez ajustado el pH, se adicionó el agar bacteriológico y se calentó a ebullición. Se esterilizó a 120°C por 15 minutos.

#### 4.3.2. Medio infusión de pulpa de café (*medio A*)

El medio infusión de pulpa de café, es un medio de líquido que se empleó para evaluar la capacidad de degradación de la cafeína. Este medio se preparó de la misma manera que se prepara el *medio Aa*, con la única diferencia que no se le agregó agar.

#### 4.3.3. Medio infusión café – sacarosa - agar (*medio Ba*)

Se colocaron 40 g de café molido (Grand'Mère "familial", café Grand'Mère S. A., Francia) en una cafetera marca Kurp® junto con 700 mL de agua destilada. Una vez preparada la infusión de café, ésta fue filtrada a través de un filtro de papel Whatman No. 41. Posteriormente se adicionaron las sales minerales. El volumen se aforó a 1 L y el pH se ajustó a 5.5 empleando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se agregó el agar bacteriológico y se calentó a ebullición. El medio se esterilizó a 120°C por 15 minutos.

#### 4.3.4. Medio infusión de café - sacarosa (*medio B*)

El medio infusión de café - sacarosa, es un medio líquido que se empleó para evaluar la capacidad de degradación de la cafeína. Este medio se preparó de la misma manera que se preparó el *medio Ba*, con la única diferencia que no se le agregó agar.

#### 4.3.5. Medio infusión de café – ácido tánico - agar (*medio C*)

Se preparó una infusión de café como se describe en la *sección 4.3.3*. El volumen se ajustó a 800 mL. Posteriormente se agregó el agar bacteriológico y se calentó a ebullición. El medio se esterilizó a 120°C por 15 minutos. El ácido tánico se disuelve en 200 mL de agua y se agrega por filtración (membrana Millipore de 0.45µm) al medio previamente esterilizado. Posteriormente el pH se ajusta con una solución estéril de NaOH 4N. El objetivo de esterilizar el ácido tánico por filtración, obedece a que sufre una hidrólisis si éste es calentado.

#### 4. Medio cafeína - ácido tánico (*medio D*)

En un vaso de precipitados se colocaron 300 mL de agua destilada y se disolvió el ácido tánico en un matraz EM de 1000 mL con 70 mL de agua destilada y se adicionó la cafeína y las sales minerales. Una vez disueltos todos los componentes, la solución de cafeína con las sales minerales se esterilizó a 120°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar la solución, posteriormente la solución de ácido tánico se filtró por una membrana Millipore 0.45 µm). El pH fue ajustado a 5.5 con una solución estéril de  $H_2SO_4$ .

#### 4.1. Medio cafeína - sacarosa (*medio E*)

En un matraz Erlenmeyer (100 mL) se colocaron 50 mL de agua destilada en los cuales se disolvió la cafeína. En otro matraz EM se colocaron 50 mL de agua destilada y se adicionó la sacarosa y las sales minerales. El pH de la solución de sales, se ajustó a 5.7 empleando  $H_2SO_4$  (para obtener un pH final de 5.5). Una vez disueltos todos los componentes, se esterizaron ambas matraces a 120°C durante 15 minutos. Se dejaron enfriar las soluciones y se mezclaron en un matraz estéril. Se comprobó que al mezclar todos los componentes juntos, hay una ligera precipitación.

#### 3. Medio sulfato de amonio - ácido tánico (*medio F*)

*Medio F*, se preparó de la misma manera que se preparó el *medio D*, con la única diferencia de que se sustituyó la cafeína por el sulfato de amonio en las proporciones indicadas en *tabla 4.3*.

#### 9. Medio sulfato de amonio - sacarosa (*medio G*)

Se colocaron en un matraz EM 1000 mL de agua destilada y se disolvieron todos los componentes. Se ajustó el pH a 5.5. Se esterilizó a 120°C durante 10 minutos.

#### 4.10. Medio cafeína, sulfato de amonio - ácido tánico, sacarosa (*medio H*)

50 mL de agua destilada fueron colocados en un matraz EM, donde se disolvió la cafeína. En un vaso de precipitados se colocaron 300 mL de agua destilada y disolvió el ácido tánico. En

otro matraz EM se colocaron 600 mL de agua destilada y se adiciono la sacarosa y las sales minerales. Una vez disueltos todos los componentes, se esterilizaron ambos matraces a 120°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar las soluciones y se mezclaron en condiciones estériles. Posteriormente la solución de ácido tánico se adicionó por filtración (membrana Millipore 0.45 µm). Se ajustó el pH a 5.5 con una solución estéril de NaOH 4N.

#### 4.4. CONDICIONES DE CULTIVO

En esta sección se explica, la forma en que se inoculó cada uno de los medios de cultivo y las condiciones de cultivo utilizadas en cada uno de los diferentes experimentos.

##### 4.4.1. Crecimiento radial

A partir del tubo de conservación, se hizo una reactivación sobre *medio Aa*. Después de 4 a 7 días de incubación a 30°C, este precultivo es utilizado para inocular las cajas de Petri que se usaron para evaluar el crecimiento radial.

Los medio empleados para evaluar el crecimiento radial fueron los siguientes: infusión de pulpa de café - agar (*medio Aa*) y Agar Papa Dextrosa (PDA). Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

El crecimiento radial fue evaluado en cajas de Petri (Trinci, 1969), las cuales fueron llenadas con 30 mL de *medio Aa* y se utilizó medio PDA como control. Se dejó solidificar el medio y posteriormente se inoculó por picadura en el centro de la caja (*Figura 4.1a*), después se incubaron a 30°C. La base de la caja de Petri se dividió en cuatro partes con un marcador a partir del centro de inoculación para hacer las lecturas del crecimiento del hongo del centro hacia las orillas (*Figura 4.1b*). Las lecturas se tomaron cada 12 horas durante los primeros 4 días y posteriormente cada 24 horas, hasta que se invadiera totalmente la superficie. Los valores de las pendientes se calcularon en la fase de crecimiento lineal, obteniendo de esta manera la velocidad de crecimiento radial en unidades de longitud por unidad de tiempo ( $\text{mm h}^{-1}$ ).

Se usó la técnica de inoculación por picadura, colocando la caja de Petri boca abajo y en esta posición se realizó la incubación, esto es para evitar el escape debido al manejo que se le dé a las cajas de Petri. Se realizaron varias lecturas en el crecimiento del microorganismo.

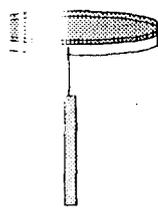
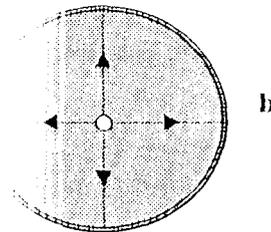


Figura 4.1. a) Inoculación por picadura de las cajas de Petri.



b) División de las cajas de Petri para la medición del crecimiento radial.

#### Crecimiento longitudinal

Tras el periodo de conservación, se hizo un precultivo en un tubo de ensayo a 30°C, este precultivo se usó para evaluar el crecimiento radial.

Para el crecimiento longitudinal se emplearon tubos de Ralph (Flores *et al.*, 1995), los cuales se llenaron con 30 mL de medio *Aa* y se taparon con el taponado posteriormente para inocular en un tubo de ensayo, después se incubaron a 30°C. Las lecturas se tomaron cada 12 horas hasta que invadieron totalmente la superficie. La velocidad de crecimiento longitudinal se expresó en  $\text{mm h}^{-1}$ . Se tuvo cuidado de no voltear ni inclinar los tubos de ensayo para evitar el desplazamiento de esporas y así evitar la formación de falsas lecturas en el crecimiento del microorganismo. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

Después de 4 a 7 días de incubación sobre medio *Aa*. Después de 4 a 7 días de incubación sobre medio *Aa* se usó para inocular las cajas de Petri que se usaron para evaluar el crecimiento radial. Para el crecimiento longitudinal se emplearon tubos de Ralph (Flores *et al.*, 1995), los cuales se llenaron con 30 mL de medio *Aa* y se taparon con el taponado posteriormente para inocular en un tubo de ensayo, después se incubaron a 30°C. Se midió la distancia que invadía el hongo durante los primeros 4 días y posteriormente se midió hasta que invadieron totalmente la superficie. La velocidad de crecimiento longitudinal se expresó en  $\text{mm h}^{-1}$ . Se tuvo cuidado de no voltear ni inclinar los tubos de ensayo para evitar el desplazamiento de esporas y así evitar la formación de falsas lecturas en el crecimiento del microorganismo. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

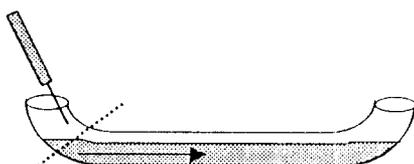


Figura 4.2. Inoculación y lectura del crecimiento longitudinal.

#### 4.4.3. Evaluación de la capacidad de degradar la cafeína

La capacidad de degradar la cafeína, se evaluó en dos medios, el primero a partir de una infusión de pulpa de café (*medio A*) y el segundo a partir de una infusión de café molido (*medio B*).

##### 4.4.3.1. Degradación de la cafeína en el medio infusión pulpa de café (*medio A*)

Se hicieron dos precultivos sobre *medio Aa*, poniendo a incubación a 30°C por un periodo de 7 días cada precultivo. Para la producción del inóculo se empleó el mismo medio (*medio Aa*), haciendo una inoculación de las esporas antes de que solidificara el medio. Después de 7 días de incubación a 30°C, las esporas fueron recolectadas con una solución estéril de Tween 80 al 0.01% (v:v).

Para evaluar la capacidad del microorganismo para degradar la cafeína en el *medio A*, el cultivo se realizó en matraces EM bañados de 250 mL con 60 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo se inoculó con una concentración de  $1 \cdot 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup>. Los matraces fueron incubados a 30°C durante 72 horas con una agitación de 115 rpm. Se tomó 1 mL de muestra en condiciones estériles cada 12 horas durante 72 horas. Al tiempo cero y al tiempo final se evaluó: el pH, la producción de biomasa y la concentración de cafeína. La biomasa fue separada por filtración utilizando papel filtro Whatman No 41. Con el filtrado libre de células se hicieron los análisis de pH y cafeína.

#### 4.4.3.2. Degradación de la cafeína en el medio infusión de café-sacarosa (*medio B*)

Se hicieron los ensayos sobre *medio B* sometiéndolo a incubación a 30°C por un periodo de 7 días cada precultivo. Para la producción del inóculo se empleó el mismo medio (*medio Ba*), haciendo una inoculación con las esporas antes de que solidificara el medio. Después de 7 días incubando a 30°C, las esporas fueron recolectadas con una solución estéril de Tween 80 al 0.01% (v/v). Para evaluar la capacidad del microorganismo para degradar la cafeína en el *medio B* se emplearon las mismas condiciones y se hicieron los mismos análisis que en la sección 4.4.3.1.

#### 4.4.4. Empleo del método de conservación y adaptación de *Penicillium commune* V33A2 sobre la degradación de la cafeína

Para evaluar el método de conservación y adaptación de cepas, se procedió a conservar al hongo con la capacidad de degradar la cafeína en cuatro formas distintas:

- I. Cepa conservada en un medio *Ba* como se indica en la sección 4.2).
- II. Cepa conservada en un medio *B* como se indica en la sección 4.2).
- III. Esporas recolectadas a partir del medio Agar Papa Dextrosa (PDA).
- IV. Esporas recolectadas a partir del medio *Ba*.

Para los casos III y IV, las esporas recolectadas a partir de estos medio, posteriormente fueron liofilizadas.

A partir de los *medios I, II, III y IV* se hicieron dos precultivos sobre medio infusión de café agar (*medio Ba*) a 30°C por un periodo de 7 días cada precultivo. La producción del inóculo se realizó sobre el *medio Ba*, haciendo las esporas antes de que solidificara el medio. Después de 7 días de incubación a 30°C, se realizó la cosecha de esporas, con una solución estéril de Tween 80 al 0.01% (v/v).

Para evaluar la degradación de la cafeína se empleó el medio de cultivo B. El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml. de medio de cultivo. El medio de cultivo se inoculó con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . Los matraces fueron incubados a 30°C durante 72 horas con una agitación de 150 rpm. Se tomó 1 ml. de muestras en condiciones

estériles cada 12 horas durante 72 horas, para análisis de cafeína y al tiempo cero y al tiempo final se evaluó el pH y la producción de biomasa. La biomasa fue separada por filtración utilizando papel filtro Whatman No 41. Con el filtrado libre de células se hicieron los análisis de pH y cafeína.

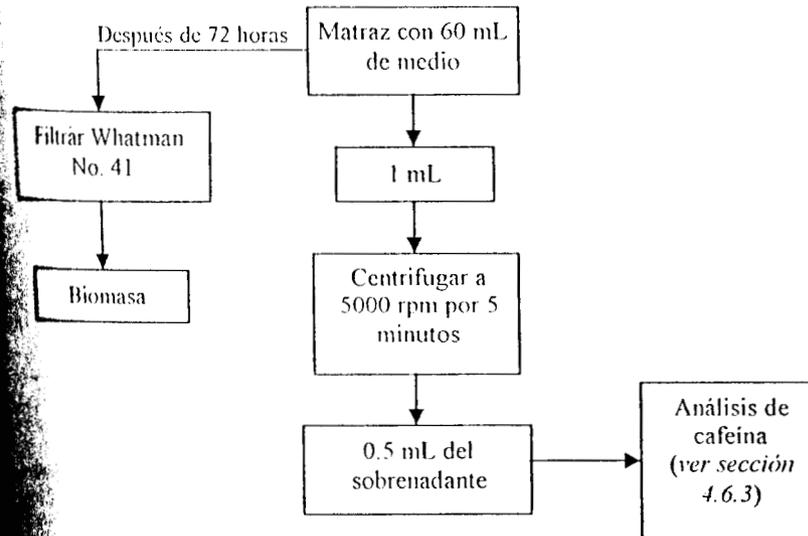
#### 4.4.5. Degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico

Sobre el medio de cultivo infusión de café con ácido tánico y agar, medio de cultivo C, (Tabla 4.2) se realizaron dos precultivos, poniendo a incubación a 30°C por un periodo de 7 días cada precultivo. La producción de esporas también se realizó en este mismo medio (medio Ba), haciendo una inoculación de las esporas antes de que solidificara el medio. Después de 7 días a 30°C, las esporas fueron recolectadas con una solución estéril de Tween 80 al 0.01% (v:v).

Para evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre la degradación de la cafeína se emplearon los medios de cultivo D, E, F, G y H (Tabla 4.3). Los cultivos se realizaron en matraces EM bafleados de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo. Los matraces fueron incubados a 30°C durante 120 horas con una agitación de 115 rpm. En cada periodo de muestreo se tomaron 2 matraces para evaluar la biomasa, 2 matraces para el análisis de la actividad cafein-desmetilasa (CD). Se tomaron muestras cada 24 horas durante 120 horas. El medio de cultivo, se inoculó con una concentración de  $1 \cdot 10^6$  esporas  $\text{mL}^{-1}$ . La biomasa fue separada por filtración utilizando papel filtro Whatman No 41. Con el filtrado libre de células se hicieron los análisis de pH, cafeína, ácido tánico y actividad extracelular de la TAH.

#### 4.5. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En la *Figura 4.3*, mediante un diagrama de bloques se describe el tratamiento que se les dio a las muestras para evaluar la capacidad de degradación de la cafeína y el método de conservación.



*Figura 4.3.* Tratamiento de las muestras para evaluar la capacidad de degradación de la cafeína y el método de conservación.

El tratamiento de las muestras para evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre la capacidad de degradación de cafeína, se resume en la *Figura 4.4*.

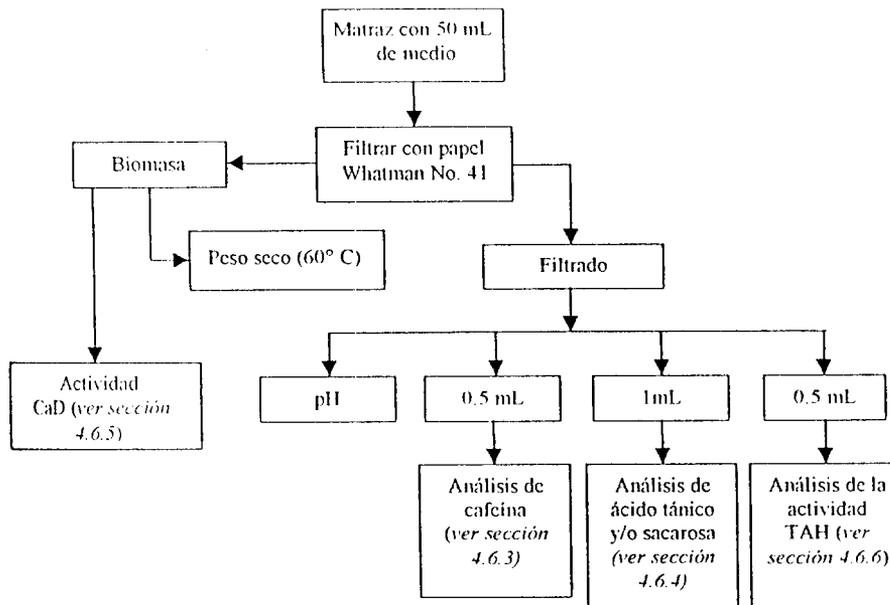


Figura 4.4. Tratamiento de las muestras para evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre la capacidad de degradación de cafeína.

#### 4.6. TÉCNICAS ANALÍTICAS

A continuación se describen cada una de las técnicas analíticas utilizadas en el presente trabajo.

##### 4.6.1. Peso seco

La cuantificación de la biomasa se hizo por gravimetría. Primeramente, se puso papel filtro Whatman No. 41 a peso constante a 60°C durante 24 horas, en una estufa marca Felisa. Después de transcurridas las 24 horas, el papel filtro se colocó en un desecador y se dejó enfriar (2 horas, aproximadamente). El papel filtro se pesó en una balanza analítica Ohaus Analytical Plus, y posteriormente el medio de cultivo se filtró. La biomasa se lavó 3 veces con suficiente agua destilada (300 mL aproximadamente) y se puso en la estufa a 60°C a peso constante.

Después, la muestra se sacó y se colocó en el desecador, dejándola enfriar. El papel filtro se pesó con la muestra seca

**Cálculos:**

$$X = (P_f - P_i) * 20$$

donde  $X$  = Biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ )

$P_f$  = Peso final del filtro con la muestra seca.

$P_i$  = Peso inicial del filtro

$$20 = \frac{1000 \text{ mL}}{50 \text{ mL}}$$

#### 4.6.2. pH

La medición del pH se efectuó directamente sobre el medio de cultivo libre de células (Figuras 4.3 y 4.4). La medición fue realizada con potenciómetro digital Conductronic pH 20 previamente calibrado con soluciones patrón (Hycl de México, S.A. de C.V.) de pH 4 y 7 a 25°C (AOAC, 1987).

#### 4.6.3. Extracción y análisis de la cafeína por HPLC

Para el análisis cuantitativo de la cafeína presente en el medio de cultivo, las muestras son preparadas a partir del medio libre de células.

La extracción de la cafeína se realizó siguiendo la metodología propuesta por Denis (1996) según el siguiente protocolo: en un tubo de ensaye se colocaron 0.5 mL de muestra (fase acuosa) y se le adicionó 1.5 mL de cloroformo:isopropanol (85:15; v:v). Se agitó a velocidad máxima en un vortex marca Thermolyne® modelo 37600, durante 30 segundos y se dejó reposar el mismo tiempo. La fase orgánica (fase inferior) fue recuperada en un segundo tubo. Se procedió a realizar una segunda y tercera extracción de la misma manera (sobre la fase acuosa), recuperando la fase orgánica en el segundo tubo. El solvente fue evaporado a baño de temperatura controlada a 60°C y bajo una campana de extracción. Una vez evaporado todo el solvente, se adicionó 1.5 mL de agua desionizada y se agitó durante 30 segundos en las mismas condiciones antes mencionadas. Esta solución se filtró a través de una membrana Millipore

(0.45  $\mu\text{m}$ ). Se hizo la dilución adecuada para tener una concentración máxima de 50  $\text{mg L}^{-1}$ . Las muestras así tratadas se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

#### Análisis de cafeína por HPLC

Las características del cromatógrafo utilizado, fueron las siguientes:

- **Bomba:** Beckman®, modelo 116.
- **Automuestreador:** Beckman®, modelo 507 con un volumen de inyección de 100  $\mu\text{L}$ .
- **Precolumna:** Beckman® Ultrasphare ODS (5  $\mu\text{m}$ ), 4.6 mm\*4.5 cm.
- **Columna:** Beckman® Ultrasphare ODS C18 (5  $\mu\text{m}$ ) de fase reversa, 4.6 mm\*25 cm.
- **Temperatura:** Temperatura ambiente (25°C).
- **Detector UV:** Beckman®, modelo 168.
- **Sistema de integración:** Beckman® GOLD system®.

Las características de análisis, fueron las siguientes:

- **Fase móvil:** Acetonitrilo 10% (v:v), isocrático.
- **Flujo:** 2  $\text{mL min}^{-1}$ .
- **Absorbancia:** 273 nm.
- **Sonicador:** Branson 2200
- **Curva Patrón:** de 0-250  $\text{mg L}^{-1}$  con cafeína anhidra 99% Fluka Chemika®.

#### 4.4.4. Análisis de ácido tánico y sacarosa

El ácido tánico y la sacarosa, fueron evaluados espectrofotométricamente ( $\lambda=480$  nm) usando el método de fenol-ácido sulfúrico, reportado por Aguilar *et al.*, (1999).

##### Preparación de la muestra:

Se hizo una dilución (con agua desionizada) de la muestra libre de células, de tal forma de tener un volumen de 1 mL con una concentración de 2  $\text{g L}^{-1}$  de ácido tánico, de sacarosa o de la mezcla (ácido tánico y sacarosa). Las muestras que contenían ácido tánico se congelaron con agua líquida y posteriormente todas las muestras fueron almacenadas en congelación hasta su análisis.

**Preparación de la solución reactivo:**

Se preparó una solución de 1 mg de fenol grado reactivo por 1 mL de ácido sulfúrico grado reactivo. Esta solución debe de prepararse en el momento de realizar el análisis. Es recomendable colocar un vaso de precipitado en agua fría y primero agregar el ácido sulfúrico y posteriormente el fenol.

**Determinación de azúcares:**

Los tubos de ensayo con 1 mL de muestra, se colocaron en un baño con agua fría. Se adicionaron lentamente 2 mL de solución reactivo a cada uno de los tubos, procurando que la solución resbale por las paredes de tubo. Los tubos de ensayo se agitaron perfectamente dentro del baño de agua fría. Las muestras se colocaron en un baño de agua a ebullición durante 5 minutos. Se dejaron enfriar las muestras y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro marca Shimadzu modelo UV-160A, a una longitud de onda de 480 nm. Se preparó un blanco con agua desionizada de la misma forma que la muestra.

**Preparación de la curva patrón:**

Se preparó una solución patrón de ácido tánico (0.25 g) y se aforó a 100 mL. Se realizó lo mismo para 0.2 g de sacarosa y finalmente para una mezcla con 0.219 g de ácido tánico y 0.04 g de sacarosa. Para preparar la curva se mezclaron las cantidades de solución y agua que se muestran en la *Tabla 4.4*.

La curva patrón se preparó y se leyó al mismo tiempo que la muestra.

Tabla 4.4. Curva patrón de ácido tánico, sacarosa o mezcla de ácido tánico y sacarosa

Curva patrón de ácido tánico			Curva patrón de sacarosa			Curva patrón de ácido tánico/sacarosa		
soln. patrón <sup>a</sup>	agua <sup>a</sup>	conc. final <sup>b</sup>	soln. patrón <sup>a</sup>	agua <sup>a</sup>	conc. final <sup>b</sup>	soln. patrón <sup>a</sup>	agua <sup>a</sup>	Conc. Final <sup>b</sup>
0	1000	0	0	100	0	0	1000	0
160	840	0.4	200	800	0.4	160	840	0.4
320	680	0.8	400	600	0.8	320	680	0.8
480	520	1.2	500	500	0.1	480	520	1.2
640	360	1.6	600	400	1.2	640	360	1.6
800	200	2.0	800	200	1.6	800	200	2.0
1000	0	2.5	1000	0	2.0	1000	0	2.5

a: solución patrón [=]  $\mu\text{L}$ ; b: concentración final [=]  $\text{g L}^{-1}$ .

#### 4.6.5. Actividad cafeín-desmetilasa (CD)

La actividad cafeín-desmetilasa CD, fue realizada de acuerdo a la metodología propuesta por *Rezil* (1999).

Todo el proceso para realizar el rompimiento celular y la extracción enzimática se llevó a cabo a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Captura celular:** Se filtró el medio de cultivo a través de papel Whatman No. 41 y la biomasa se lavó 4 veces con suficiente agua desionizada (300 mL aproximadamente) y posteriormente se lavó con 100 mL de buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.8. La biomasa se maceró en un homogenizador tipo Tenbrock de vidrio con una capacidad de 15 mL, adicionando una solución de buffer de fosfatos 50 mM y pH 7.8 con *DL*-ditiotreitól, DTT 5 mM (5 mL de buffer por cada 2 g de biomasa), se lavó el homogenizador con 1 mL de buffer con DTT. La biomasa macerada se centrifugó en una centrifuga Beckman modelo J2-HS con un rotor Beckman JA a 15,000 rpm durante 45 minutos a  $2^{\circ}\text{C}$ . Durante el proceso de centrifugación la muestra se dividió en tres fases y con una jeringa se separó la fase media y se filtró a través de una membrana Millipore (0.45  $\mu\text{m}$ ), para así obtener el extracto bruto (EBi).

**Reacción enzimática:** en un tubo eppendorf de 1.5 mL de capacidad se adicionaron 10  $\mu$ L de cafeína 5 mM, 2  $\mu$ L de DTT 0.1 M y 83  $\mu$ L del EBi. Se incubó a 30°C durante 90 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se adicionó 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% y se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga eppendorf modelo 5402. Posteriormente, se colocaron 50 mL de la mezcla en un frasco para hacer el análisis en el HPLC y se adicionaron 450 mL de agua desionizada. Las muestras se guardaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

**El blanco,** se preparó de la siguiente manera: se colocaron 5  $\mu$ L de TCA al 50%, 10  $\mu$ L de cafeína 5 mM, 2  $\mu$ L de DTT 0.1 M y 83  $\mu$ L del EBi. La reacción se realizó de la misma manera que con el EBi.

Una unidad de enzima (UI) fue definida como la unidad de enzima capaz de degradar 1  $\mu$ mol de cafeína por mL por minuto.

#### 4.6.6. Actividad Tanin-acil-hidrolasa (TAH)

La actividad enzimática Tanin-acil-hidrolasa (TAH), se desarrolló de acuerdo al método reportado por Beverini y Metche (1990).

**Actividad enzimática extracelular:** Se filtró el medio de cultivo a través de papel Whatman No 41. El medio de cultivo libre de células se denominó extracto bruto extracelular (EBe).

**Reacción enzimática:** en un tubo de ensayo, se colocó 1 mL de solución de ácido tánico 0.51 g L<sup>-1</sup> en buffer de acetato 0.1 M pH 5 y posteriormente se adicionaron 50  $\mu$ L del EBe, se agitó a velocidad media en un vortex marca Thermolyne® modelo 37600, durante 5 segundos. Se incubó a 30°C durante 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación se adicionaron 200  $\mu$ L de HCl 2 N y se agitó en el vortex, posteriormente se filtró a través de una membrana de polipropileno (0.45  $\mu$ m). Para preparar los controles de cada muestra, se desarrolló la actividad enzimática agregando 200  $\mu$ L de HCl antes de adicionar el EBe.

Una unidad enzimática (UI) se definió como la cantidad de enzima necesaria para producir un  $\mu$ mol de ácido gálico por mL de extracto enzimático bruto por un minuto, bajo las condiciones de análisis.

#### 4.6.7. Análisis de Ácido gálico por HPLC

Para el análisis de ácido gálico se utilizó un cromatógrafo de líquidos con las siguientes características:

- **Bomba:** Constametric®, modelo 3200 (Thermo Separation Products®).
  - **Automuestreador:** Beckman®, modelo 507 con un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ .
  - **Precolumna:** Spherisorb® ODS (5  $\mu\text{m}$ ), 4.6 mm\*4.5 cm.
  - **Columna:** Spherisorb® ODS C18 (5  $\mu\text{m}$ ) de fase reversa, 4.6 mm\*25 cm.
  - **Temperatura:** Temperatura ambiente (25°C).
  - **Detector con arreglo de diodos:** Spectromonitor®, modelo 500 (Thermo Separation Products®).
  - **Sistema de integración:** Lctalk HPLC Software®.
- Las características de análisis, fueron las siguientes:
- **Fase móvil:** Metanol-ácido fórmico 1% (v:v) en una relación 5:95 (v:v).
  - **Flujo:** 1.5 mL  $\text{min}^{-1}$ .
  - **Absorbancia:** 280 nm.
  - **Curva Patrón:** de 0-1000 mg  $\text{L}^{-1}$  con ácido gálico, SIGMA®.

#### 4.7. EXPRESIÓN DE RESULTADOS

##### 4.7.1. Cálculo de la velocidad de crecimiento radial y longitudinal

La velocidad de crecimiento radial y longitudinal ( $VC_R$  y  $VC_L$ ), se calculó graficando la distancia invadida por el micelio (mm) contra el tiempo (h), a partir del crecimiento exponencial se calculó la pendiente, lo cual nos da como resultado la  $VC_R$  en unidades de  $\text{mm h}^{-1}$ .

##### 4.7.2. Cálculo de la tasa volumétrica de consumo de la cafeína y la fuente de carbono

Los resultados de consumo de cafeína se graficaron contra el tiempo, para posteriormente calcular la pendiente, lo cual nos proporcionaría la tasa volumétrica de consumo de la cafeína ( $V_{caf} = \text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

De igual forma se hizo para calcular la tasa volumétrica de consumo de la fuente de carbono ( $VFC$ ).

##### 4.7.3. Cálculo de la actividad cafeín-desmetilasa (CD)

La expresión de la actividad Cafeín-desmetilasa (CD) se realizó a partir de los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de cafeína por HPLC. Se expresaron de la siguiente manera:

$$\Delta C = (C_{\text{inicial}} - C_{\text{final}}) * D$$

donde

$\Delta C$ : Cafeína consumida ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$C_{\text{inicial}}$ : Blanco, resultados del HPLC ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

$C_{\text{final}}$ : Muestra, resultados del HPLC ( $\text{mg L}^{-1}$ )

D: Factor de dilución de la muestra para análisis en HPLC

Actividad Cafeín-desmetilasa (U.I. =  $\mu\text{mol} * \text{mL}^{-1} * \text{min}^{-1}$ )

$$A. \text{ Ca.D.} = (\Delta C) * V_r * V_{\text{extr}}^{-1} * \text{PM}^{-1} * \text{Tr}^{-1} * E$$

Donde

$\Delta C$ : Cafeína consumida ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

$V_r$ : Volumen de reacción (L)

$V_{\text{extr}}$ : Volumen del EBi (mL)

PM Cafeína : 194.9 ( $\mu\text{g} * \mu\text{mol}^{-1}$ )

Tr : Tiempo de reacción (90 min<sup>-1</sup>)

E : Factor de Dilución de la Muestra

#### 4.7.4. Cálculo de la actividad Tanin-acil-hidrolasa (TAH)

La expresión de la actividad Tanin-acil-hidrolasa (TAH) se realizó a partir de los resultados obtenidos del análisis cuantitativo de ácido gálico por HPLC. Se expresaron de la siguiente manera:

$$\Delta G = (G_{\text{final}} - G_{\text{inicial}})$$

donde

$\Delta G$ : Acido Gálico liberado (mg L<sup>-1</sup>)

$G_{\text{inicial}}$ : Blanco, resultados del HPLC (mg L<sup>-1</sup>).

$G_{\text{final}}$ : Muestra, resultados del HPLC (mg L<sup>-1</sup>)

Actividad Tanil-Acil-Hidrolasa (U.I. =  $\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ )

$$A. T.A.H. = (\Delta G) \cdot V_r \cdot V_{\text{extr}}^{-1} \cdot \text{PM}^{-1} \cdot \text{Tr}^{-1}$$

donde

$\Delta G$ : Acido Gálico liberado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )

$V_r$ : Volumen de reacción (L)

$V_{\text{extr}}$ : Volumen del EBe (mL)

$\text{PM}$  Acido gálico : 188.1 ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{mol}^{-1}$ )

$\text{Tr}$  Tiempo de reacción (30 min<sup>-1</sup>)

#### 4.8. Cálculo de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )

Existen un gran número de modelos cinéticos que han sido desarrollados para describir el comportamiento de las poblaciones de los microorganismos. Para calcular la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), se evaluaron tres modelos:

Modelo exponencial (Pirt, 1975):  $\frac{dX}{X} = \mu dt$  (1)

Al integrar la ecuación (1) y despejando el término  $X$  se tiene que:

$$X = X_n \exp^{\mu t} \quad (2)$$

donde  $X = X(t)$ ,  $X_0$  es la biomasa inicial al tiempo  $t = 0$  y  $\mu$ , es la velocidad específica de crecimiento.

Modelo logístico (Mulcandani y Luong, 1989): 
$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left( \frac{1 - X}{X_{max}} \right) \quad (3)$$

Integrando la ecuación (3) y despejando  $X$ , se obtiene la siguiente ecuación:

$$X = \frac{X_{max}}{1 + \left( \frac{X_{max} - X_0}{X_0} \right) \exp(-\mu t)} \quad (4)$$

donde  $X_{max}$ , es el valor máximo de  $X$ .

Modelo de Gompertz (Draper y Smith, 1966): 
$$\frac{dX}{dt} = \mu X \ln \left( \frac{X_{max}}{X} \right) \quad (5)$$

Al integrar la ecuación (5) y se despeja el término  $X$ , se tiene que:

$$X = X_{max} \exp \left( -b \exp(-\mu t) \right) \quad (6)$$

donde  $b$  es una constante de valor positivo, donde  $P_0 = P_{max} \exp(-b)$

Para el cálculo de  $\mu$  en cada modelo, se utilizó una rutina no lineal con ayuda de la herramienta Solver de la hoja de cálculo Microsoft® Excel 97.

De los tres modelos evaluado, se seleccionó el que proporcionara un coeficiente de correlación cercano a la unidad, entre los datos experimentales y el modelo evaluado (anexos).

#### 4.1.6. Cálculo de los coeficientes $\alpha$ , $\beta$ y $\alpha * \mu$ del modelo de Luedeking y Pirt

La tasa de formación de producto ( $q_p$ ) esta dada por (Pirt, 1975):

$$q_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (7)$$

donde  $P$  = concentración del producto,  $X$  = concentración de la biomasa.

Para evaluar la producción de metabolitos de interés para el hombre, se han propuesto varios

modelos matemáticos de interés para el hombre. Tres de estos modelos han sido útiles en la

descripción del comportamiento de sistemas simples. Estos modelos son:

Modelo asociado al crecimiento

b) modelo no asociado al crecimiento

c) modelo parcialmente asociado al crecimiento

Luedeking y Piret en 1959, propusieron la siguiente ecuación:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (8)$$

para expresar la productividad de las fermentaciones ácido lácticas, cuando la formación de producto está "parcialmente asociado al crecimiento". Este mismo modelo ha sido utilizado exitosamente en diversos procesos.

Si la ecuación (8) se divide entre la biomasa ( $X$ ), se tiene:

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \alpha \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + \beta \quad (9)$$

Reemplazando la ecuación (1) y (7) en la ecuación (9), se tiene que:

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (10)$$

De esta manera, hay un término asociado ( $\alpha\mu$ ) y no asociado ( $\beta$ ) al crecimiento.

En el presente trabajo el producto de nuestro interés es una enzima, (CD), por lo cual,  $P=E$  y

$q_p = q_E$  en las ecuaciones correspondientes.

Si se grafican los valores de  $q_E$  y  $\mu$  en la fase exponencial, para cada intervalo de tiempo, entonces la pendiente será el coeficiente  $\alpha$  y la ordenada al origen será el coeficiente  $\beta$ , de acuerdo a la ecuación 10.

4.8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

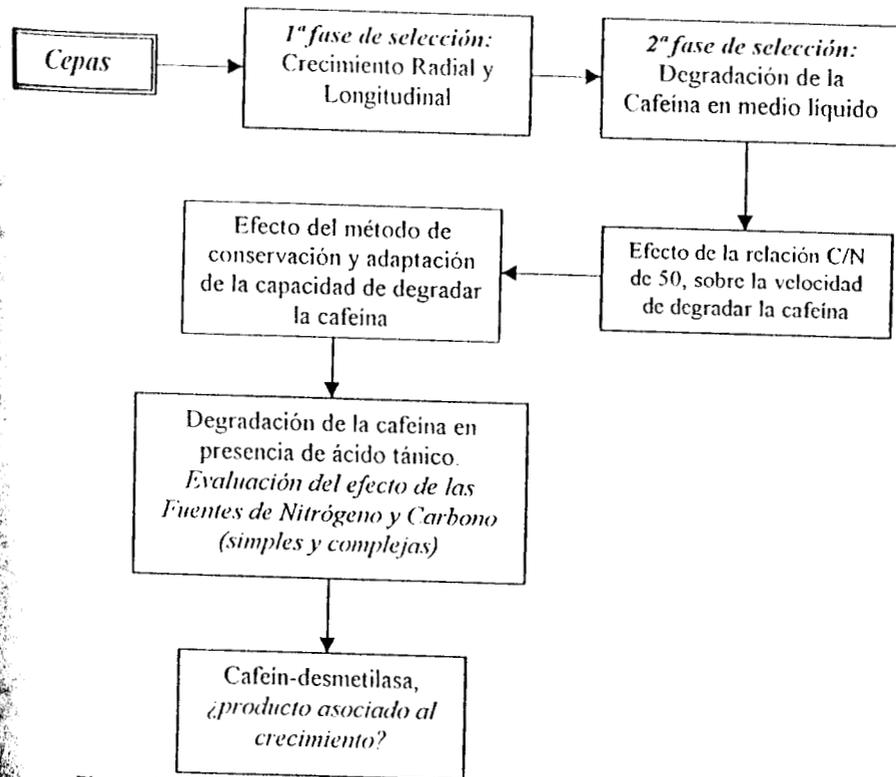


Figura 4.5. Diagrama de flujo de la estrategia seguida en el presente trabajo.

amente, se hizo una selección de hongos filamentosos tomando en cuenta dos criterios:  
 primero será evaluar la velocidad de los hongos para invadir determinado sustrato. El  
 organismo seleccionado será posteriormente utilizado en estudios de fermentación en  
 medio sólido usando la pulpa de café fresca como soporte, entonces para hacer esta etapa se  
 usará un medio en el cual los nutrientes sean similares a los que se encuentran en la pulpa de  
 café.  
 Segundo criterio será conocer el porcentaje de cafeína que degrada(n) el(los) hongo(s)  
 seleccionado(s) en medio líquido. Para lo cual se utilizaron dos medios de cultivo, el primero

preparado a partir de pulpa de café, con lo que se pretende que cuente con una cantidad de nutrientes similar a los de la pulpa de café, y el segundo medio se prepara a partir de una infusión de café molido, donde el(los) hongo(s) estará(n) limitado en nutrientes.

Una vez seleccionada la cepa que degrada el mayor porcentaje de cafeína presente en el medio de cultivo, se inducirá la producción de la enzima TAH, con el objetivo de degradar la cafeína y al mismo tiempo los compuestos fenólicos o taninos, y evaluar el efecto de la adición de fuentes de nitrógeno y carbono simples. Finalmente se estudiará si la actividad CD, está asociada o no al crecimiento del microorganismo.

*CAPÍTULO 5*

---

*SELECCIÓN DE CEPAS*

## SELECCIÓN DE CEPAS

---

La selección de cepas se realizó en dos etapas. Para la primera fase se preparó un medio de cultivo con agar a partir de una infusión de pulpa de café, donde se tomó como criterio de selección la velocidad de invasión de los hongos filamentosos. Posteriormente las cepas seleccionadas se sembraron en un medio de agar con infusión de café, para proporcionar a los microorganismos las condiciones para diferenciar de una forma rápida aquellas que pudiesen degradar la cafeína. La segunda fase de la selección, consistió en seleccionar una cepa teniendo como criterio la capacidad de degradación de la cafeína.

### 5.1. PRIMERA FASE DE SELECCIÓN DE CEPAS: CRECIMIENTO RADIAL Y LONGITUDINAL

El diámetro de las colonias, la velocidad de crecimiento radial,  $VC_R$  (Trinci, 1969) y la velocidad de crecimiento longitudinal,  $VC_L$  (Flores *et al.*, 1995), son parámetros de crecimiento empleados en bioensayos y en investigaciones fisiológicas para caracterizar a los microorganismos.

Diversos métodos han sido propuestos para evaluar la velocidad de invasión de los hongos sobre sustrato modelo (Trinci, 1969; Roussos *et al.*, 1995; Flores *et al.*, 1995; Meneses, 1998), en este estudio el sustrato utilizado será preparado a partir de una infusión de pulpa de café fresca.

#### 5.1.1. Velocidad de crecimiento radial y longitudinal

Se utilizaron cajas de Petri y tubos de Ralph, los cuales contenían un medio de cultivo preparado a base de una infusión de pulpa de café con agar, además se utilizó el medio agar con dextrosa (PDA) como control. Tanto la preparación del medio de cultivo, como la inoculación de las unidades experimentales, se detallan en el *Capítulo 4*.

En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestra la velocidad de crecimiento radial y longitudinal respectivamente en  $\text{mm h}^{-1}$ , para cada un de las cepas evaluadas tanto en el medio PDA como en el preparado a partir de infusión de pulpa de café (*medio Aa*).

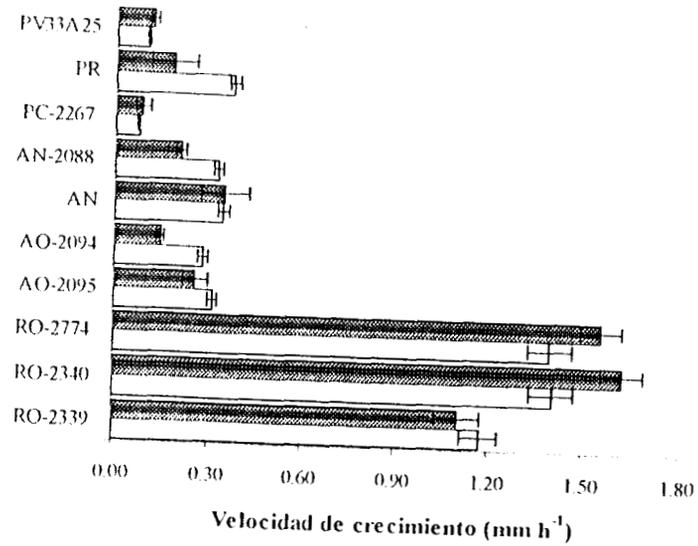


FIGURA 5.1. Crecimiento radial en el medio PDA ( $\square$ ) y en el *medio Aa* ( $\blacksquare$ ), de las cepas de hongos estudiadas. *R. oryzae* 2339, (RO-2339); *R. oryzae* 2340, (RO-2340); *R. oryzae* 2774, (RO-2774); *A. oryzae* 2095, (AO-2095); *A. oryzae* 20954, (AO-2094); *A. niger* 2088, (AN-2088); *A. niger*, (AN); *P. camemberti* 2267, (PC-2267); *P. roqueforti*, (PR); *P. commune* V33A25, (PV33A25).

En ambas figuras se observa, que las cepas del género *Rhizopus* presentaron una mayor  $VC_R$  y  $VC_L$  respectivamente, lo cual se explica por el crecimiento particular de los hongos de este género: crecimiento rápido, seco y sus esporas fácilmente acrotransportables (Inui *et al.*, 1965; Schipper y Stalpers, 1984). La velocidad de invasión fue de 1.10 a 1.62  $\text{mm h}^{-1}$  para el crecimiento radial y de 1.06 a 1.49  $\text{mm h}^{-1}$  para el crecimiento longitudinal (Tabla 5.1), ambas

sobre el medio preparado a partir de los nutrientes solubles de la pulpa de café fresca (medio *Aa*).

La velocidad de crecimiento radial y longitudinal de las demás cepas fue de 0.35 a 0.9 mm h<sup>-1</sup> (VC<sub>R</sub>) y de 0.36 a 0.70 mm h<sup>-1</sup> (VC<sub>L</sub>). Siendo la cepa de *P. camemberti* 2267, la que presentó la velocidad de crecimiento radial y longitudinal más lenta que las otras cepas.

Los resultados de velocidad de crecimiento longitudinal (Figura 5.2) obtenidos para las cepas de *A. oryzae*, *A. niger*, *P. roqueforti* y *P. commune* V33A25 presentan valores de crecimiento medio con respecto a los reportados para *A. oryzae* (0.24 mm h<sup>-1</sup>), *A. niger* (0.23 mm h<sup>-1</sup>), *P. roqueforti* (0.14 mm h<sup>-1</sup>), *P. commune* V33A25 (0.15 mm h<sup>-1</sup>) en un medio preparado a partir de infusión de café (Aquiahuatl, 1992).

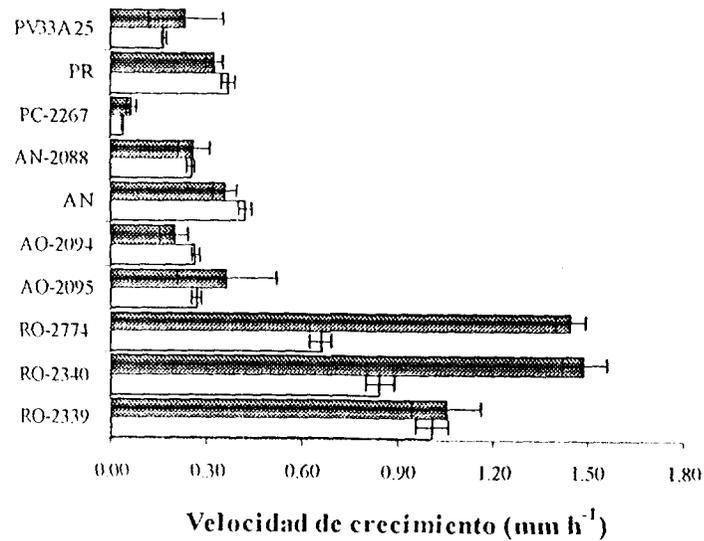


FIGURA 5.2. Crecimiento longitudinal en el medio PDA (□) y en el medio *Aa* (■) para los diferentes cepas estudiadas. *R. oryzae* 2339, (RO-2339); *R. oryzae* 2340, (RO-2340); *R. oryzae* 2774, (RO-2774); *A. oryzae* 2095, (AO-2095); *A. oryzae* 20954, (AO-2094); *A. niger* 2088, (AN-2088); *A. niger*, (AN); *P. camemberti* 2267, (PC-2267); *P. roqueforti*, (PR); *P. commune* V33A25, (PV33A25).

La diferencia de resultados entre las cepas de un género y otro es explicable, ya que cada una de las cepas posee una habilidad característica para crecer sobre cierto sustrato, tal como sucede con otras actividades metabólicas de los microorganismos como son, la producción de enzimas, la producción de metabolitos secundarios, entre otras, las cuales también son susceptibles de modificarse dependiendo de las condiciones del medio ambiente. Como se mencionó anteriormente, tanto el método de crecimiento radial como el crecimiento longitudinal, han sido propuestos para evaluar la capacidad de invasión de los hongos sobre un sustrato, por lo cual se analizó la correlación entre ambos métodos.

### 3.1.2. Correlación entre la velocidad de crecimiento radial y longitudinal

Con los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento radial y longitudinal de cada una de las cepas, graficamos el crecimiento radial contra el crecimiento longitudinal y de esta manera se obtuvo el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y así poder saber si entre estos métodos existe alguna correlación.

En la Tabla 5.1 se hace un resumen de los valores de velocidad de crecimiento radial y longitudinal para cada una de las cepas evaluadas y además se muestra el  $R^2$  obtenido entre los dos métodos utilizados. Los valores de  $R^2$ , que corresponden a la comparación de la velocidad de crecimiento radial y longitudinal para cada cepa, dichos valores de se encuentran en  $R^2 = 0.99$  y  $0.89$ .

Tabla 5.1. Velocidad de crecimiento radial y longitudinal y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) entre el crecimiento radial ( $C_R$ ) y el crecimiento longitudinal ( $C_L$ ) sobre el medio de infusión de pulpa de café con agar (*medio Aa*)

Cepa	Velocidad de Crecimiento ( $\text{mm h}^{-1}$ )		Coeficiente de correlación ( $R^2$ ) entre el $C_R$ y el $C_L$
	Radial ( $VC_R$ )	Longitudinal ( $VC_L$ )	
RO-2339	$1.10 \pm 0.07$	$1.06 \pm 0.11$	0.93
RO-2340	$1.62 \pm 0.07$	$1.49 \pm 0.07$	0.98
RO-2774	$1.56 \pm 0.06$	$1.45 \pm 0.05$	0.98
AO-2095	$0.26 \pm 0.04$	$0.36 \pm 0.16$	0.94
AO-2094	$0.14 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.04$	0.99
AN	$0.35 \pm 0.08$	$0.36 \pm 0.03$	0.89
AN-2088	$0.21 \pm 0.02$	$0.26 \pm 0.05$	0.97
PC-2267	$0.09 \pm 0.02$	$0.07 \pm 0.02$	0.96
PR	$0.18 \pm 0.07$	$0.33 \pm 0.03$	0.98
V33A25	$0.12 \pm 0.01$	$0.24 \pm 0.12$	0.98

Por tanto, se sugiere emplear el método de crecimiento radial como un parámetro para la selección de cepas que se quieran utilizar posteriormente para procesos de fermentaciones. Cabe destacar que aunque hay diferencia en la velocidad de crecimiento entre las cepas, todas mostraron la habilidad para crecer sobre un medio preparado a partir de infusión de pulpa de café.

Por lo tanto, se muestran las cepas en orden de mayor a menor velocidad de invasión, tomando en cuenta la velocidad de crecimiento radial.

Las cepas *R. oryzae* 2340, *R. oryzae* 2774, *P. oryzae* 2339, *A. niger*, *A. oryzae* 2095, *A. niger* 2088, *P. noqueforti*, *A. oryzae* 20954, *P. commune* V33A25 y *P. camemberti* 2267.

Es importante resaltar que las cepas del género *Phizopus* presentaron un crecimiento rápido y eficiente en este medio de cultivo, lo que sugiere que este género de hongos es capaz de crecer en este medio de cultivo.

buscar nutrientes. En cambio las cepas del género *Aspergillus* y *Penicillium*, presentaron un crecimiento lento, pero denso. Trinci (1969), reportó que la densidad de la colonia depende del ambiente en que se encuentre el hongo. También observó que cuando un sustrato contiene una concentración elevada de nutrientes, el microorganismo crece más densamente, produciendo hifas aereadas y más esporuladas.

## 5.2. SEGUNDA FASE DE SELECCIÓN DE CEPAS: CAPACIDAD DE DEGRADAR LA CAFEÍNA

Para poder realizar la segunda fase de selección de cepas previamente seleccionadas, primero se realizó una resiembra sobre un medio de infusión de café (*medio Ba*) e incubando a 25°C durante 7 días, para poner de manifiesto de una forma rápida y cualitativa a las cepas que pueden degradar la cafeína.

De las diez cepas evaluadas en la sección 5.1, únicamente cuatro fueron capaces de crecer en el medio preparado a partir de la infusión de café (*medio Ba*), las cuales fueron *Aspergillus oryzae* 2095, *Aspergillus oryzae* 2094, *Penicillium roqueforti* y *Penicillium commune* V33A25, considerando que la característica de crecer sobre este medio de cultivo puede ser indicativa de la posible asimilación de la cafeína.

Una vez identificadas las cepas antes mencionadas, se procedió a realizar la segunda etapa de la selección, que consistió en seleccionar una cepa teniendo como criterio de evaluación la capacidad de degradación de la cafeína en medio líquido.

Las cepas *A. oryzae* 2095, *A. oryzae* 2094, *P. roqueforti* y *P. commune* V33A25 fueron cultivadas en el *medio Aa* (infusión de pulpa de café) para limitar al hongo en nutrientes. Dado que el hongo seleccionado, será utilizado en estudios posteriores utilizando la pulpa de café como sustrato, se propusieron dos medios de cultivo, el primero preparado a partir de una infusión de pulpa de café (*medio A*) y el segundo preparado a partir de una infusión de café (*medio B*).

Los medios de cultivo utilizados contienen una concentración inicial de cafeína de 0.5 g L<sup>-1</sup>. Los medios de cultivo *A* y *B*, se describen en las secciones 4.3.2 y 4.3.4, y las condiciones de cultivo se detallan en la sección 4.4.3.

### 5.2.1. Evaluación de la capacidad de degradación de la cafeína

En las Figuras 5.3 y 5.4, se muestran los resultados de degradación de la cafeína presente en los medios líquidos preparados a partir de una infusión de pulpa de café (*medio A*) y a partir de una infusión de café (*medio B*), respectivamente, para cada una de las cepas evaluadas en esta sección. La concentración inicial de cafeína en los medios de cultivo fue de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ . En ambas gráficas se representa la concentración de cafeína y la producción de biomasa obtenida al final de 72 horas de fermentación. Los resultados son los promedios de los datos obtenidos por triplicado.

En la Figura 5.3 se observa que la cepa PV33A25, degradó  $0.05 \text{ g L}^{-1}$  de la cafeína, lo cual representa el 10% de la cafeína inicial presente en el medio preparado a partir de una infusión de pulpa de café fresca (*medio A*), y produjo  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa en un periodo de 72 horas. Las demás cepas alcanzaron a degradar únicamente entre el 4 y el 8% de la cafeína total de medio de cultivo mientras que la producción de biomasa fue de  $0.92$  a  $1.01 \text{ g L}^{-1}$ , en 72 horas de fermentación.

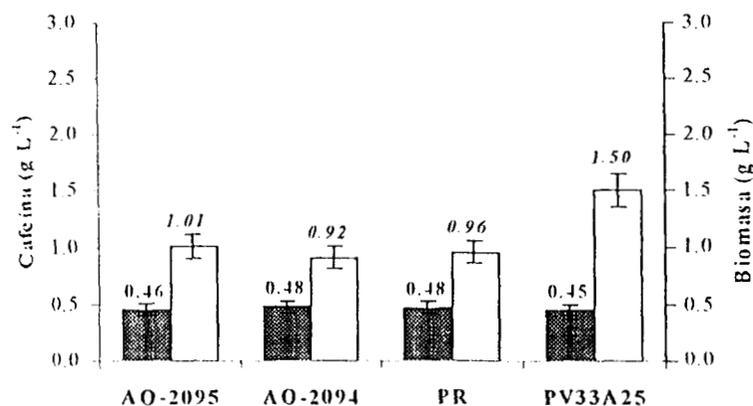


FIGURA 5.3. Concentración de cafeína (■) y producción de biomasa (□) al final de 72 horas de fermentación, utilizando un medio de infusión de pulpa de café (*medio A*).

*A. oryzae* 2095, (AO-2095); *A. oryzae* 2094, (AO-2094);

*P. roqueforti*, (PR) y *P. commune* V33A25, (PV33A25).

Por otra parte, cuando se utiliza el medio preparado a partir de una infusión de café (*medio B*) para evaluar la degradación de la cafeína presente en el medio de cultivo (*Figura 5.3*), se observa que la cepa PV33A25 degradó  $0.2 \text{ g L}^{-1}$  de la cafeína, lo que presenta el 40% de la cafeína inicial y produjo  $2.67 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa después de 72 horas de fermentación. El resto de las cepas evaluadas (AO-2095, AO-2094 y PR) degradaron entre el 6 y el 8% de cafeína inicial y la concentración de biomasa final obtenida fue de  $0.94$  a  $1.09 \text{ g L}^{-1}$ .

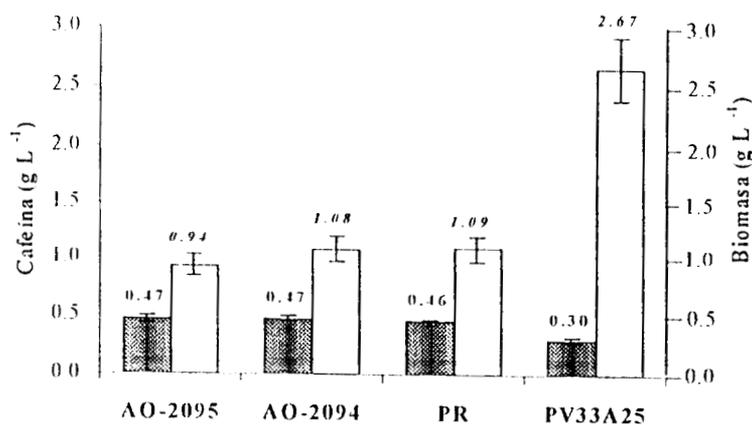


FIGURA 5.4. Concentración de cafeína (■) y producción de biomasa (□) al final de 72 horas de fermentación, utilizando un medio de infusión de café (*medio B*).

*A. oryzae* 2095, (AO-2095); *A. oryzae* 2094, (AO-2094);

*P. roqueforti*, (PR) y *P. commune* V33A25, (PV33A25).

Los datos encontrados en la bibliografía (Bressani *et al.*, 1972; Elias, 1978; Zuluaga, 1981), se emplean para justificar los resultados de degradación de cafeína obtenidos utilizando un medio de cultivo preparado a partir de una infusión de pulpa de café (*medio A*), ya que en éste medio, la cafeína no es la única fuente de nitrógeno, sino que en la pulpa de café se encuentran además de ella, una gran cantidad de compuestos nitrogenados de conformación molecular más sencilla que la cafeína, como son los aminoácidos y las proteínas principalmente (Bressani *et al.*, 1972;

Has, 1978; Zuluaga, 1981), los cuales son asimilados más fácilmente por el microorganismo antes de utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno (Deacon, 1993).

Por lo anterior, se decidió utilizar el medio preparado a partir de una infusión de café (medio B) para evaluar la degradación de la cafeína. Dicho medio está más limitado tanto en nitrógeno como en las fuentes de carbono que si se utilizará el medio preparado a partir de la infusión de pulpa de café (medio A)

Utilizando el medio preparado a partir de la infusión de café, se observa un 30% de aumento en la capacidad de *P. commune* V33A25 para degradar la cafeína que si se utiliza el medio preparado a partir de la infusión de pulpa de café. Pero estos resultados no son del todo satisfactorios, debido a que Aquihuatl, en 1992 reportó la degradación de la cafeína por *P. commune* V33A25, alcanzando niveles de degradación del 82%, después de 72 horas de incubación, utilizando un medio de cultivo preparado a partir de una infusión de café.

Este hecho sugiere, que las tres resiembras realizadas a la cepa, no fueron suficientes. Razón por la que se decidió comprobar la capacidad de degradación de la cafeína de la cepa que reportó un mayor porcentaje de degradación de cafeína presente en el medio preparado a partir de la infusión de café, *Penicillium commune* V33A25, realizando un total de 6 precultivos, para la producción del inóculo.

#### 4.4.2. Comprobación de la capacidad de degradación de la cafeína

Como se mencionó anteriormente, Aquihuatl (1992), reportó 82% de degradación de la cafeína en un periodo de 72 horas, en un medio preparado a partir de infusión de café y los resultados observados en el presente trabajo, muestran que la misma cepa (*P. commune* V33A25) alcanza niveles de degradación del 40% en las mismas condiciones.

Para comprobar la capacidad de degradación de la cafeína por la cepa de *P. commune* V33A25, se decidió a realizar 6 precultivos sobre el medio de infusión de café con agar (medio Ba).

La selección del inóculo, la inoculación del medio de cultivo y las condiciones de incubación fueron como se indica en la sección 4.4.3.2. La evaluación de la capacidad de degradación de la cafeína se realizó utilizando el medio de infusión de café (medio B).

En la Figura 5.5 se presenta el porcentaje de degradación de la cafeína presente en el medio B, después de 3 y 6 precultivos de *P. commune* V33A25. El resultado obtenido muestra una degradación de la cafeína del 92% en un periodo de 72 horas, haciendo un total de 6 resiembras sobre el medio Ba, con lo cual se mejoró la degradación de la cafeína.

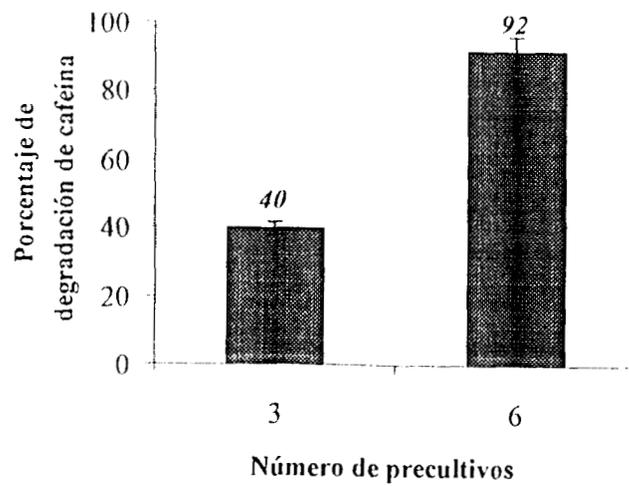


FIGURA 5.5. Porcentaje de degradación de la cafeína por *P. commune* V33A25, después de 72 horas, utilizando el medio preparado a partir de infusión de café (medio B).

En lo cual se comprueba los datos reportados por Aquiahuatl en 1992, donde indica que la cepa de *Penicillium commune* V33A25, presenta el mayor porcentaje de degradación de la cafeína, 82%. Resultados que incluso fueron mejorados con las seis resiembras, mostrando una degradación del 92% de la cafeína inicial del medio de cultivo.

Como se puede observar, las resiembras realizadas al microorganismo mejoraron la capacidad de éste para degradar la cafeína; es decir, fue necesario un periodo de adaptación de un sistema enzimático que puede intervenir en el transporte y metabolismo de la cafeína, por el microorganismo.

Es necesario un periodo de adaptación de un sistema enzimático para que el microorganismo metabolice la cafeína, lo cual sugiere, que la actividad enzimática responsable de la degradación de la cafeína es inducible.

### 5.3. CONCLUSIÓN

Los dos métodos de evaluación de la velocidad superficial de invasión de un sustrato (velocidad de crecimiento radial,  $VC_R$  y velocidad de crecimiento longitudinal,  $VC_L$ ) dan resultados similares para las cepas de hongos estudiadas. Sin embargo la velocidad de crecimiento radial ( $VC_R$ ), es un método más sencillo y rápido que evaluar la velocidad del crecimiento longitudinal ( $VC_L$ ). Además de que se pueden obtener otros datos como la densidad de producción de biomasa.

Esta sencilla prueba de crecimiento permite seleccionar cepas con crecimiento rápido, ya que en la mayoría de los procesos en medio sólido, donde se requiera utilizar algún microorganismo, es importante garantizar que habrá un crecimiento rápido para evitar la contaminación por algún otro microorganismo indeseable, y además disminuir los tiempos en el proceso.

Las cepas de *R. oryzae* 2340, *R. oryzae* 2774, *R. oryzae* 2339, presentaron la mayor velocidad de crecimiento observándose un crecimiento rápido y superficial. Las cepas de *A. niger*, *R. oryzae* 2095, *A. niger* 2088, *P. roqueforti*, *A. oryzae* 20954, *P. commune* V33A25 y *Penicillium* 2267, presentaron una lenta velocidad de crecimiento, pero dicho crecimiento fue denso, a diferencia de las cepas del género *Rhizopus*.

Al sembrar las diez cepas sobre un medio preparado a partir de infusión de café con agar (medio Ba), únicamente las cepas de *A. oryzae* 2095, *A. oryzae* 2094, *P. roqueforti* y *P. commune* V33A25 fueron capaces de crecer sobre este medio, la característica de crecer sobre este medio de cultivo se consideró como indicativa de la posible asimilación de la cafeína.

Se observó que la velocidad de crecimiento sobre el medio de infusión de pulpa de café (*medio Aa*), no está relacionada con la capacidad del microorganismo para degradar la cafeína. La mejor forma de evaluar la capacidad de degradación de la cafeína, fue utilizando el medio de propagación preparado a partir de infusión de café con agar (*medio Ba*) y el medio de cultivo preparado a partir de una infusión de café (*medio B*), debido a que es un medio que tiene como principal fuente de nitrógeno cafeína, esto limitará al microorganismo a utilizar esta fuente de nitrógeno para poder crecer, para tal proceso antes deberá sintetizar algún mecanismo enzimático con el cual podrá degradar la cafeína para su metabolismo (por ejemplo: producción de biomasa, de proteínas, ARN).

Realizando 3 precultivos, la cepa de *Penicillium commune* V33A25, después de 72 horas de incubación, degradó el 40% de la cafeína inicial del medio preparado a partir de la infusión de café. Dicha capacidad se aumentó, realizando un total de 6 precultivos sobre el *medio Ba* (infusión de café con agar), de tal manera que se obtuvo una degradación de la cafeína inicial del 92%.

Estos resultados llevaron a proponer un método de conservación y adaptación para que una vez expresado el sistema enzimático responsable de la degradación de la cafeína, éste sistema enzimático se mantenga expresado en el microorganismo.



## EFFECTO DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN Y ADAPTACIÓN DE *Penicillium commune* V33A25 SOBRE LA DEGRADACIÓN DE LA CAFEÍNA

De las enzimas que una célula es capaz de producir, cierto número siempre están presentes en concentraciones basales, sin tener en cuenta el medio en que el microorganismo esté creciendo (Wang, 1979). La inducción de las enzimas está definida como un incremento relativo en la tasa de síntesis de una enzima en específico, resultado de la exposición a alguna sustancia química, que se le denomina "inductor". Las enzimas inducibles son necesarias cuando el microorganismo se encuentra limitado. La inducción asegura que la energía y los aminoácidos no sean desperdiciados en formar enzimas innecesarias pero que, cuando se requieren, estas enzimas pueden ser formadas rápidamente (Wang, 1979).

Por otro lado, la capacidad para conservar exitosamente una gran variedad de microorganismos, ha representado un logro mayor en el área de la microbiología en el último siglo. Parte de este éxito, es reflejado en el desarrollo industrial de la microbiología (Smith 1991). La selección del método de conservación depende de varios factores, por ejemplo; las colecciones industriales ponen mucho énfasis sobre las técnicas que puedan mantener la estabilidad genética, especialmente para aquellas cepas que tienen alguna característica fundamental para el proceso industrial, tal es el caso para la producción de antibióticos y enzimas.

El objetivo de este Capítulo, es conocer si una vez expresada la capacidad de degradación de cafeína en la cepa seleccionada (*Penicillium commune* V33A25), dicha actividad es modificada por el método de conservación y adaptación utilizado.

### 6.1. MEDIOS DE CULTIVO Y MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y ADAPTACIÓN

Los medios de propagación y de cultivo utilizados, fueron preparados a partir de una infusión de pulpa de café con agar (*medio Aa*), de una infusión de café con agar (*medio Ba*) y el medio líquido preparado con una infusión de café (*medio B*). La composición de los medios de cultivos se muestra en la *Tabla 4.2* y la forma de preparar cada uno de los medios se presenta en la *sección 4.3*.

Los diferentes métodos de conservación y adaptación, y las condiciones para evaluar la degradación de la cafeína fueron los siguientes:

- I. *Cepa conservada en un medio de infusión de café con agar (medio Ba).*
- II. *Cepa conservada en un medio de infusión de pulpa de café con agar (medio Aa).*
- III. *Esporas recolectadas a partir de medio Agar Papa Dextrosa (PDA).*
- IV. *Esporas recolectadas a partir de medio Ba.*

En los casos III y IV, las esporas recolectadas a partir de estos medios, fueron liofilizadas.

Para todos los casos la cepa de *P. commune V33A25* fue reactivada realizando 3 resiembras sobre el *medio Ba* (excepto para el *método II*, donde se realizaron un total de 6 resiembras sobre el *medio Ba*) a 30°C durante 6 días y la degradación de la cafeína se evaluó sobre el *medio B* (infusión de café) como se indica en la *sección 4.4.4*.

### 4.2. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DE LA CAFEÍNA OBSERVADA EN LOS DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y ADAPTACIÓN

*P. commune V33A25* fue sometido a cuatro diferentes métodos de conservación y adaptación antes de ser inoculado en un medio líquido con cafeína (*medio B*). En la *Figura 6.1* se muestra la degradación de la cafeína por *P. commune V33A25* conservado por los cuatro métodos propuestos y realizando muestreos cada 12 horas durante un periodo de 72 horas.

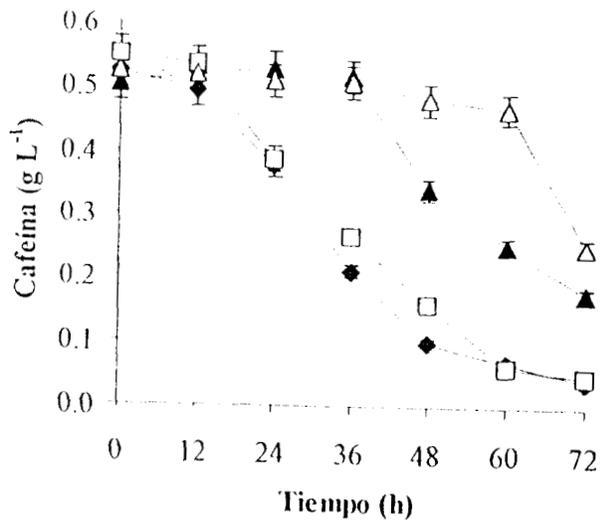


Figura 6.1. Influencia del método de conservación y adaptación sobre la capacidad de *P. commune* V33A25 para degradar la cafeína, utilizando el medio líquido preparado a partir de infusión de café (*medio B*). Cepa conservada con el método I, (□); con el método II (◆); el método III, (△) y el método IV, (▲). *P. commune* V33A25 fue resembrado 3 veces sobre el *medio Ba* y para el método II fue resembrado 6 veces sobre el *medio Ba*.

Las esporas de *P. commune* V33A25 fueron recolectadas a partir de medio agar papa (PDA) y posteriormente liofilizadas (*método III*), se observó una fase de retardo o latencia en la degradación de la cafeína de aproximadamente 60 horas. Sin embargo, cuando las esporas fueron recolectadas a partir del medio de infusión de café con agar (*medio Ba*) y liofilizadas (*método II*), la fase de retardo es más corta y después de 36 horas se observa el comienzo de la degradación de la cafeína.

El método III, no es método de conservación y adaptación recomendable, debido a que la actividad del microorganismo para degradar la cafeína, se ve afectada mostrando un retardo de 60 horas en el inicio del consumo del alcaloide.

El *método II*, es una buena alternativa de conservación y adaptación de la capacidad del hongo para degradar la cafeína. La hifización es un método recomendable para conservar microorganismo por periodos de tiempo largos (años), además de que al conservar al microorganismo con este método se observa un retardo de 36 horas para que el microorganismo comience a degradar la cafeína.

El retardo en la degradación de la cafeína, observada en los *métodos III* y *IV*, puede ser explicado, probablemente por el daño relativo que sufren las esporas durante el proceso de hifización. Esto es debido a que la hifización permite la deshidratación del hongo a un nivel que detiene su metabolismo (Smith, 1991).

En el caso de la conservación de *P. commune V33A25* en el medio preparado a partir de la infusión de café con agar (*método I*) y en el medio preparado a partir de la infusión de pulpa de café con agar (*método II*), la degradación de la cafeína presentó una fase lag de 12 horas y velocidades de degradación de  $0.01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (*Tabla 6.1*), lo cual permitió obtener el 92 % de degradación de la cafeína después de 72 horas, en ambos casos. Pero hay que recordar que para el *método II*, se realizaron un total de 6 resiembras (2 veces más que para los demás métodos de conservación y adaptación).

**Tabla 6.1.** Retardo en el inicio de la degradación de la cafeína, velocidad y porcentaje de degradación de la cafeína por *Penicillium commune V33A25*, utilizando cuatro métodos de conservación y adaptación

Método de conservación y adaptación				
	I	II	III	IV
Time lag (en la degradación de la cafeína)	12 h	12 h	60 h	36 h
Velocidad de degradación de la cafeína ( $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )	0.011	0.010	0.018	0.009
Porcentaje de degradación de la cafeína (%) a las 72 horas	92.0	91.3	51.9	64.7

El nivel de degradación del 92% de la cafeína presente en el medio de cultivo preparado con la infusión de café y utilizando el método de conservación I, es superior al reportado por Aquiahuatl en 1992, que conservando la cepa con el *método I*, obtuvo un 82% de degradación de la cafeína en un periodo de 72 horas.

Los resultados presentados en este experimento sugieren que la actividad enzimática responsable de la degradación de la cafeína es inducible, debido a que la degradación de ésta se incrementó considerablemente después de repetidos cultivos sobre el *medio Ba* (infusión de café con agar). Por lo cual se recomienda utilizar el método de conservación y adaptación I (medio preparado a partir de una infusión de café), para periodo de conservación cortos.

### 6.3. EFECTO DE LA RELACIÓN C/N DE 50, SOBRE LA VELOCIDAD DE DEGRADACIÓN DE LA CAFEÍNA

Denis en 1996, utilizó el *método I* para conservar la cepa de *P. commune V33A25*, con el objeto de optimizar la velocidad de degradación de la cafeína, propone utilizar una relación C/N de 50 usando sacarosa y cafeína

Por lo cual se procedió a evaluar el efecto de una relación C/N de 50, sobre la velocidad de degradación de la cafeína, utilizando la cepa de *P. commune V33A25* conservada previamente con el *método I* (medio de infusión de café con agar).

En la *Figura 6.2* se muestran los resultados de consumo de sacarosa y degradación de cafeína por *P. commune V33A25*, utilizando un medio con sacarosa y cafeína anhidra con una relación C/N de 50, de acuerdo a Denis, 1996.

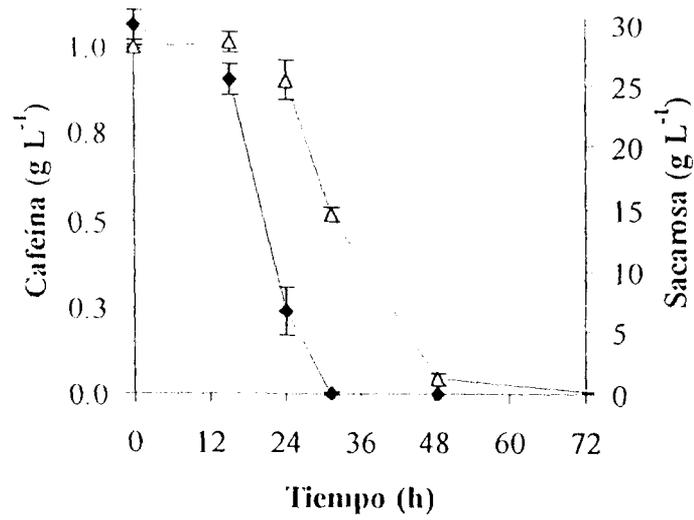


Figura 6.2. Consumo de cafeína ( $\Delta$ ) y sacarosa ( $\blacklozenge$ ) por *P. commune* V33A25, conservada con el método 1. El medio de cultivo contiene cafeína anhidra en una relación C/N de 50.

Con una relación C/N de 50, el microorganismo alcanza niveles de degradación del 96% en un periodo de 48 horas y la velocidad de degradación es de  $0.031 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , lo cual implica un aumento en la velocidad de consumo de la cafeína de 3 veces. La sacarosa es consumida totalmente a las 31 horas. Estos resultados confirman los obtenidos por Denis (1998) quien reporta niveles de degradación del 99% de la cafeína inicial en un periodo de 58 horas y la velocidad de consumo de la cafeína es de  $0.034 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

#### 6.4. CONCLUSIÓN

Cuando la cepa de *P. commune* V33A25, fue conservada utilizando el *método I* (infusión de café) o el *método II* (infusión de pulpa de café), degradó el 92 % del total de la cafeína inicial del medio de cultivo después de 72 horas de incubación.

El hongo conservado e inducido con el *método I*, mostró el mejor resultado de degradación de la cafeína, ya que la fase de retardo en el consumo de la cafeína fue de 12 horas y después de 72 horas de fermentación la cepa degradó el 92 % de la cafeína presente en el medio de cultivo preparado a partir de la infusión de café (*medio B*). La velocidad de consumo de la cafeína fue de  $0.01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Este método es recomendable para conservar la cepa por periodos de tiempo cortos (meses).

La liofilización es un método recomendable para conservar microorganismo por periodos de tiempo largos (años), por lo cual, el *método III*, también es una buena alternativa de conservación y adaptación de la capacidad del hongo para degradar la cafeína, ya que al conservar al microorganismo con este método se observa un retardo de 36 horas para que el microorganismo comience a degradar la cafeína y alcanza a degradar el 64.7% de la cafeína inicial en periodo de 72 horas.

Una vez que los mecanismos enzimáticos para degradar la cafeína han sido expresados es importante conservar la cepa sobre el *medio Ba*, con la finalidad de tener un periodo de reactivación más corto.

Utilizando un medio de cultivo con cafeína anhidra en una relación C/N de 50, la velocidad de degradación es mejorada a  $0.031 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y el nivel de degradación es de 96% en 48 horas.

Hasta el momento, este es el primer trabajo reportado sobre la influencia del método de conservación sobre la capacidad de degradación de la cafeína.

Parte de los resultados de este experimento fueron incluidos en el libro "Coffee Biotechnology and Quality", en el capítulo que lleva por nombre:

**Effect of conservation method on caffeine uptake by *Penicillium commune* V33A25**

G. Gutiérrez-Sánchez, I. Perraud-Gaime, C. Augur, J.M. Romano-Machado, G. Saucedo-Castañeda (2000) In Coffee and Biotechnology Quality; T. Sera, C.R. Soccol, A. Pandey and F. Roussos (Eds) Kluwer, Dordrecht, pp 447-753.

**CAPÍTULO 7**

---

***DEGRADACIÓN DE LA  
CAFEÍNA EN PRESENCIA DE  
ÁCIDO TÁNICO: EFECTO DE LA  
ADICIÓN DE FUENTES DE NITRÓGENO  
Y CARBONO SIMPLES***

## DEGRADACIÓN DE LA CAFEÍNA EN PRESENCIA DE ÁCIDO TÁNICO: EFECTO DE LA ADICIÓN DE FUENTES DE NITRÓGENO Y CARBONO SIMPLES

---

La pulpa de café es rica en carbohidratos y proteínas (Elias, 1979; Zuluaga, 1989), razón por la cual se ha propuesto utilizar este subproducto de la agroindustria del café, en la alimentación animal (Cabezas *et al.*, 1979; Vargas *et al.*, 1982; Abate y Pfeffer, 1986) pero la presencia de factores antifisiológicos, como la cafeína, y factores antinutricionales como los compuestos fenólicos, que restringen su uso como alimento animal.

En los últimos años, se han realizado estudios de aislamiento de cepas de hongos filamentosos, capaces de degradar la cafeína en medios sintéticos (Aquihuatl, 1992; Roussos *et al.*, 1995); sobre la degradación de la cafeína presente en la pulpa de café (Roussos *et al.*, 1994; Gaime, 1995), estudios sobre el efecto de la adición de sulfato de amonio y urea a medios de cultivo de cafeína, con el objetivo de mejorar la velocidad de degradación de la cafeína, utilizando sistemas de fermentación tanto líquida como sólida (Denis, 1996; Hakil *et al.*, 1999) Pero no se ha realizado ningún estudio en el cual se consideren además de la cafeína, a los compuestos fenólicos y/o taninos presentes en la pulpa de café.

Es importante una comprensión del efecto de las fuentes de nitrógeno y carbono sobre la degradación de la cafeína en presencia de compuestos fenólicos (ácido tánico) utilizando para ello un modelo de estudio (fermentación en medio líquido) que permita caracterizar de manera más precisa el comportamiento del *Penicillium commune* V33A25. Lo cual contribuiría al diseño, operación e implementación de bioprocesos para el aprovechamiento de la pulpa de café, así como mejorar su calidad nutrimental.

---

RESULTADOS Y DISCUSIONES

---

El objetivo de este capítulo es estudiar el efecto de la adición de fuentes de nitrógeno (sulfato de amonio) y/o carbono (sacarosa) simples, sobre la degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico.

La hipótesis que se plantea en éste capítulo, es que la presencia en el medio de una fuente de nitrógeno simple que aporte el 10% del nitrógeno total del medio y, la presencia de una fuente de carbono y energía simple que aporte el 10% del carbono total de medio de cultivo, mejorarán los niveles de degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico.

La información encontrada en la bibliografía indica que la actividad tanasa es inducible y uno de los géneros de hongos filamentosos que producen la tanasa, es *Penicillium* (Dechamps *et al.*, 1983; Bajpa y Patil, 1997; Lekha y Lonsane, 1997; Van de Lagemaat *et al.*, 1999). Por tal razón, una vez seleccionada la cepa de *P. commune* V33A25, con capacidad de degradar la cafeína, se cultivó en un medio (medio C) que además de contener cafeína (con la cual se conservaría la actividad cafeín-desmetilasa); también tiene ácido tánico, que es un inductor de la enzima tanin-acil-hidrolasa.

#### 7.1. MEDIOS DE INDUCCIÓN Y DE CULTIVO

Para adaptar la cepa de *P. commune* V33A25 al medio de cultivo, se hicieron tres resiembras sobre el medio C (Tabla 4.2), preparado a partir de una infusión de café adicionándole agar y ácido tánico al 1% (p.v), este medio de cultivo se preparó como se indica en la sección 4.3.5.

Para evaluar el efecto de la adición de fuentes de nitrógeno y carbono simples, sobre la degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico, se utilizó el medio basal descrito en la sección 4.3, al cual se modificó la fuente de nitrógeno (FN) y la fuente de carbono (FC) con las combinaciones mostradas en la Tabla 4.3. El porcentaje de nitrógeno y carbono que aportó cada componente al medio de cultivo, se muestra en la Tabla 7.1.

Tabla 7.1. Porcentaje de Nitrógeno y Carbono que aportó cada molécula al medio de cultivo. Fuente de Nitrógeno (FN) y Fuente de Carbono (FC). Todos los medios presentan una relación C/N de 50

Compuesto	Fuente	Medio de cultivo				
		D	E	F	G	H
Cafeína	FN	100	100	--	--	90
Sulfato de amonio	FN	--	--	100	100	10
Acido Tánico	FC	100	--	100	--	90
Sacarosa	FC	--	100	--	100	10

Medio de Cultivo D: Cafeína y ácido tánico.

E: Cafeína y sacarosa.

F: Sulfato de amonio y ácido tánico.

G: Sulfato de amonio y sacarosa.

H: Cafeína, sulfato de amonio, ácido tánico y sacarosa.

La forma de preparar los medios de cultivo, la inoculación, la incubación y los análisis realizados se muestran en el *Capítulo 4*. Los análisis para la biomasa y las actividades enzimáticas (cafeín-desmetilasa y tanasa) se hicieron por duplicado. Los análisis de cafeína y fuente de carbono se realizaron por cuadruplicado.

Con el fin de visualizar mejor la influencia de cada fuente de nitrógeno y carbono sobre la degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico, se agrupan los resultados obtenidos en dos partes: los medios que contienen cafeína y los medios que contienen sulfato de amonio, en ambas partes, se comparan con el medio mixto (*medio H*).

## 7.2. CAFEÍNA COMO FUENTE DE NITRÓGENO

En esta sección, se presentan los resultados obtenidos cuando la cafeína es la única fuente de nitrógeno y el ácido tánico la fuente de carbono (*medio D, Tabla 4.3*), y/o cuando el ácido tánico es sustituido por la sacarosa (*medio E*). Posteriormente estos resultados son comparados con un medio mixto (*medio H*), donde la cafeína aporta el 90% del nitrógeno del medio y el 10% restante es aportado por el sulfato de amonio, además, el ácido tánico aporta el 90% del carbono total de medios y la sacarosa aporta el 10% de la fuente de carbono restante (*Tabla 7.1*).

### 7.2.1. Producción de biomasa

En la *Figura 7.1* se muestran los resultados obtenidos para la producción de biomasa de *P. commune V33A25* en los medios de cultivo, D, E y H.

Cuando *P. commune V33A25* crece en el medio de cultivo que contiene cafeína y ácido tánico (*medio D*) presenta una fase de retardo de 72 horas y una concentración de biomasa de  $1.35 \text{ g L}^{-1}$  después de 120 horas de fermentación y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) calculada aplicando el modelo de Gompertz (*sección 4.7.5*) es de  $0.018 \text{ h}^{-1}$ . Posteriormente, si se sustituye el ácido tánico por una fuente de carbono más simple como lo es la sacarosa, no se observan cambios significativos en la fase de retardo o fase lag (duración de 72 horas); ni en la producción de biomasa al final de la fermentación ( $1.21 \text{ g L}^{-1}$ ), ni en la velocidad específica de crecimiento ( $0.015 \text{ h}^{-1}$ ).

En embargo, cuando el sulfato de amonio y la sacarosa aportan el 10% del nitrógeno y del carbono total del medio, respectivamente (*medio H, Tabla 7.1*), la fase de retardo se reduce de 72 a 24 horas, la concentración de biomasa después de 120 horas es de  $2.71 \text{ g L}^{-1}$  y la velocidad específica de crecimiento es de  $0.013 \text{ h}^{-1}$ .

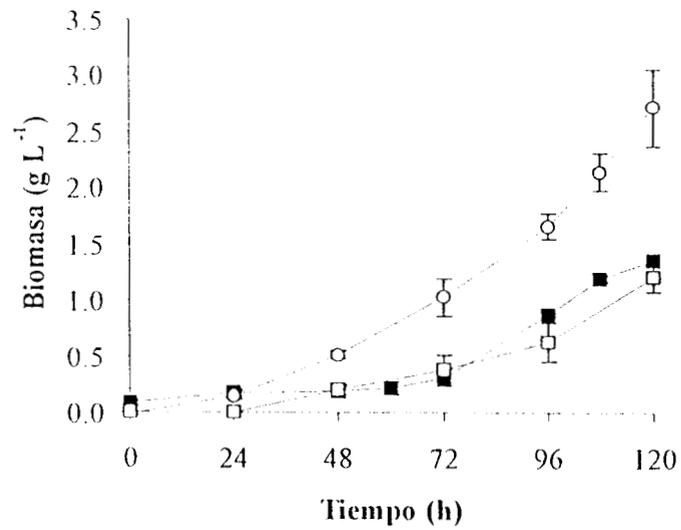


FIGURA 7.1. Producción de biomasa por *Penicillium commune* V33A25.

Medio con cafeína y ácido tánico, D (■); medio con cafeína y sacarosa, E (□).

El medio H, (O), contiene fuentes de nitrógeno y carbono mixtas.

Aún cuando la velocidad específica de crecimiento para cada medio, presenta valores muy similares ( $\mu = 0.018$ ;  $0.015$  y  $0.013$  h<sup>-1</sup>; para los medios D, E y H, respectivamente) la fase de retraso o fase de adaptación en el medio H es de tan sólo 24 horas. Es este mismo medio de cultivo, la concentración final de biomasa es mayor, además de que en el crecimiento del microorganismo no se observa ninguna fase estacionaria, a las 120 horas.

### 7.2.2. Consumo de la fuente de carbono y nitrógeno y producción de enzimas (tanasa y cafeín-desmetilasa)

El consumo de la fuente de carbono en el *medio D* (medio con cafeína y ácido tánico) inicia después de 72 horas de fermentación y a ese mismo tiempo inicia la producción de la actividad tanasa (*Figura 7.2*). Al final de las 120 horas de fermentación, *P. commune V33A25* únicamente transforma el 26.3% de la fuente de carbono inicial y la máxima actividad tanasa se observa a las 108 horas, alcanzando 0.42 U.I. de actividad TAH.

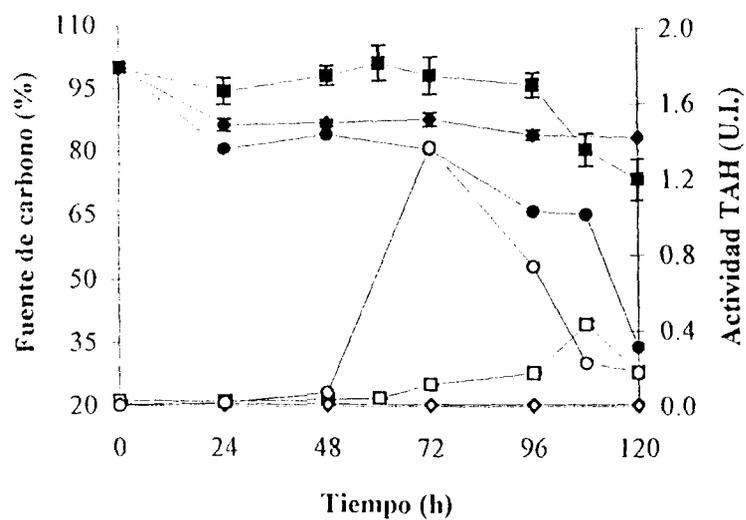


FIGURA 7.2. Consumo de la fuente de carbono y producción de la actividad TAH por *Penicillium commune V33A25*. Las figuras rellenas, representan el consumo de la FC y las figuras vacías, representan la producción de la actividad enzimática.  
Medio con cafeína y ácido tánico, *D*, (■) y (□); medio con cafeína y sacarosa, *E*, (◆) y (◇); medio mixto, *H*, (●) y (○).

El consumo de la cafeína, también presenta una fase de retardo de 72 horas (*Figura 7.3*) y al final del proceso el microorganismo consume únicamente el 27% de la cafeína inicial, observándose una máxima actividad cafeín-desmetilasa (CD) a las 72 horas (0.04 U.I.)

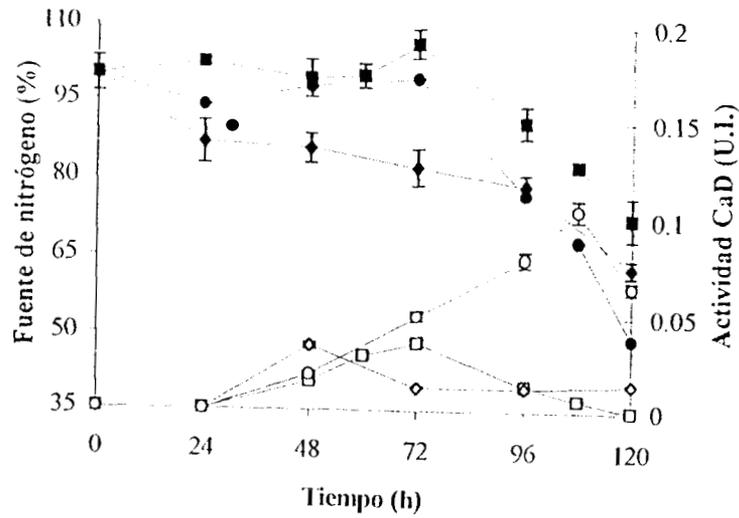


FIGURA 7.3. Consumo de la fuente de nitrógeno y producción de la actividad CD, por *Penicillium commune* V33A25. Las figuras rellenas, representan el consumo de la FN y las figuras vacías, representan la producción de la actividad enzimática.

Medio con cafeína y ácido tánico, D, (■) y (□); medio con cafeína y sacarosa, E, (◆) y (◇); medio mixto, H, (●) y (○).

Cuando se cambia de una fuente de carbono compleja (ácido tánico) a una fuente de carbono simple como lo es la sacarosa (*medio E*), el consumo de esta FC, alcanza únicamente el 16.2% después 120 horas de proceso y no se detecta actividad tanasa. Además, el porcentaje final de consumo de cafeína es de 37% y la máxima actividad CD, es de 0.03 U.I. a las 48 horas. Estos resultados de degradación de cafeína no concuerda con los mostrados en la *Figura 6.2*, donde se reactivó en un medio infusión de café con agar (*medio Ba*) y se inoculó en el *medio*

E (cafeína y sacarosa) Bajo estas condiciones el consumo de la sacarosa fue del 100% a las 31 horas y después de 48 horas el microorganismo ya había consumido el 96% de la cafeína inicial.

Tampoco concuerdan con los reportados por Denis en 1996, quién encontró que a las 58 horas, *P. commune* V33A25 degradó el 99% de la cafeína inicial, pero no reporta el consumo de la sacarosa a ese tiempo.

Esta diferencia en los niveles de degradación de la cafeína se atribuye a que para los experimentos realizados en este capítulo, la cepa fue reactivada en un medio que además de cafeína, contenía ácido tánico. A diferencia del medio de reactivación de cepas utilizado en el capítulo 6, el cual contenía cafeína y sacarosa.

Si se utiliza el medio de cultivo mixto (*medio H*) el consumo de la FC es del 67.6% a las 120 horas, la máxima actividad TAH (1.36 U.I.) se presenta a las 72 horas de fermentación y a ese mismo tiempo se observa la mayor pendiente en el consumo de la FC.

También con el *medio H*, se obtiene el mayor porcentaje de degradación de la cafeína, correspondiente al 51% en un periodo de 120 horas y la máxima actividad CD, se presenta a las 100 horas (0.10 U.I.).

### 1.3. SULFATO DE AMONIO COMO FUENTE DE NITRÓGENO

A continuación, se presentan los resultados de producción de biomasa, consumo de la fuente de carbono y producción de la enzima (TAH y CD), obtenidos al utilizar tres diferentes medios de cultivo: *medio F* (con sulfato de amonio y ácido tánico), *medio G* (con sulfato de amonio y sacarosa) y el *medio H* (sulfato de amonio, cafeína, ácido tánico y sacarosa).

#### 1.3.1. Producción de biomasa

La fuente de nitrógeno es el sulfato de amonio y la fuente de carbono es el ácido tánico. *P. commune* V33A25 presenta una fase de retardo de 24 horas, la concentración de biomasa a las 120 horas fue la más elevada alcanzando una concentración de 2.85g L<sup>-1</sup> y la velocidad específica de crecimiento es de 0.034 h<sup>-1</sup>. Al comparar estos

resultados con los obtenidos utilizando el *medio D* (cafeína y ácido tánico), se observa que la fase lag disminuye de 72 a 24 horas, la producción de biomasa aumenta  $1.5 \text{ g L}^{-1}$  y la velocidad específica de crecimiento aumenta el doble, utilizando el *medio E*.

Para el caso en que el medio de cultivo que contiene la fuente de nitrógeno y la fuente de carbono de fácil asimilación (sulfato de amonio y sacarosa, *medio G*), también se observa una fase lag de 24 horas. La producción de biomasa es de  $1.74 \text{ g L}^{-1}$  después de 120 horas y una  $\mu = 0.044 \text{ h}^{-1}$ . Al utilizar el medio mixto (*medio H*) la concentración de biomasa observada fue muy similar ( $2.71 \text{ g L}^{-1}$ ) a la obtenida con el *medio E*, pero la velocidad específica de crecimiento fue menor ( $0.013 \text{ h}^{-1}$ ).

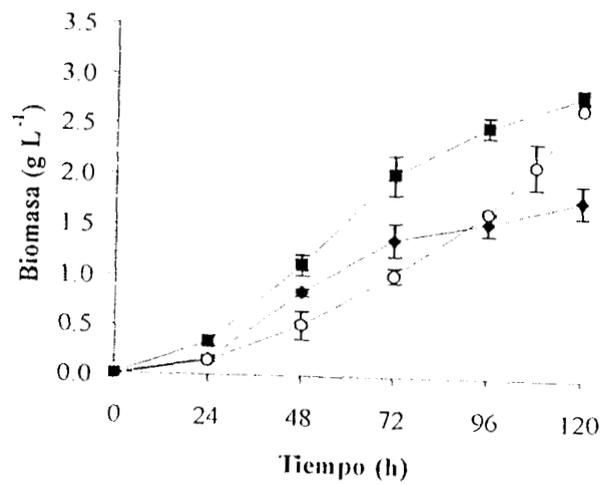


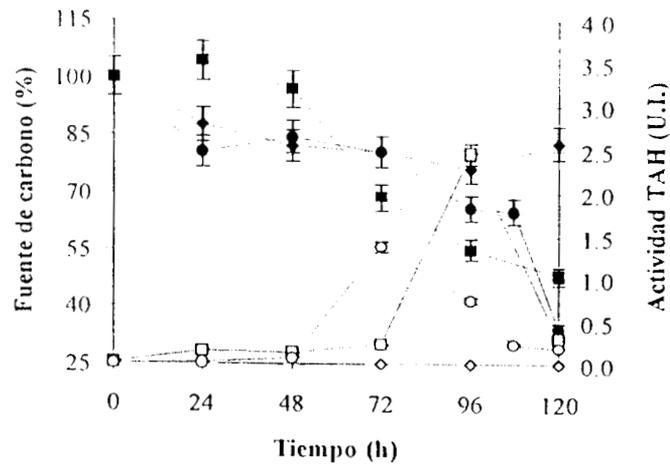
FIGURA 7.4. Producción de biomasa por *Penicillium commune* V33A25.

Medios con sulfato de amonio y ácido tánico, E (■) medio con sulfato de amonio y sacarosa, G, (◆) y medio mixto, H, (○).

### 7.3.2. Consumo de la fuente de carbono y producción de la enzima tanasa

El consumo de la fuente de carbono en el caso del medio con sulfato de amonio y ácido tánico (*medio F*) se muestran en la *Figura 7.5*, donde se observa un consumo del 51.8% de la fuente de carbono a las 120 horas y bajo estas condiciones a las 96 horas se presenta la máxima actividad TAH (2.45 U.I.) y no se detecta la actividad cafeín-desmetilasa, debido a que no hay cafeína en el medio de cultivo.

Utilizando una fuente de nitrógeno y una fuente de carbono simple (sulfato de amonio y sacarosa), el consumo de la sacarosa en el *medio G* después de 120 horas solo es del 17%, lo cual se podría atribuir a la posible existencia de un fenómeno de represión del ácido tánico sobre la enzima responsable de degradar la sacarosa, la invertasa; ya que la cepa fue reactivada por tres resiembras sobre un medio que contenía una infusión de café y ácido tánico (*medio C*, *Tabla 4.2*) y posteriormente se inoculó en un medio con sacarosa, por lo cual el microorganismo tiene que adaptarse nuevamente a ese medio de cultivo (*medio G*) y por consiguiente los niveles de consumo de la fuente de carbono se ven modificados.



**FIGURA 7.5.** Consumo de la fuente de carbono y producción de la actividad tanasa por *Penicillium commune* V33A25. Las figuras rellenas representan el consumo de la FC y las figuras vacías representan la de la actividad enzimática TAH. Medio con sulfato de amonio y ácido tánico, *F*, (■); medio con sulfato de amonio y sacarosa, *G*, (◆) y medio mixto, *H*, (○).

En cambio, cuando se utiliza el medio mixto (*medio H*) se alcanza el mayor nivel de consumo de la fuente de carbono después de 120 horas, 67.6% de la concentración inicial y a las 72 horas se obtienen 1.36 U.I. de actividad tanasa. Los niveles de producción de TAH, son menores que los obtenidos con el *medio F* (2.45 U.I. a las 96 horas), pero hay que remarcar que el *medio H*, contiene cafeína.

En la *Tabla 7.2* se agrupan los valores de los parámetros calculados para *P. commune* V33A25 cuando éste crece en los diferentes medios de cultivo evaluados.

Tabla 7.2. Parámetros cinéticos, relacionados al catabolismo y metabolismo de *Penicillium commune* V33A25, en los diferentes medios de cultivo utilizados

Parámetros calculados	Medio de cultivo				
	D	E	F	G	H
Biomasa ( $\text{g L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	1.35±0.09	1.21±0.1	2.85±0.1	1.79±0.15	2.71±0.15
$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.018±0.03	0.015±0.03	0.034±0.07	0.044±0.09	0.013±0.04
Consumo de cafeína (%) <sup>a</sup>	27.0±0.14	37.0±0.17	NA	NA	51.0±0.15
$V_{caf}$ ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	0.15±0.03	0.07±0.01	NA	NA	0.22±0.01
Consumo de la FC (%) <sup>a</sup>	26.3±2.9	16.2±1.6	51.8±1.71	17.0±5.8	67.6±3.4
$V_{FC}$ ( $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	3.04±0.03	0.27±0.02	3.45±0.03	0.49±0.01	5.59±0.8
Actividad TAH máxima (U.L.)	0.42 (108 h)	ND	2.45 (96 h)	ND	1.36 (72 h)
Actividad CD máxima (U.L.)	0.04 (72 h)	0.03 (48 h)	ND	ND	0.10 (108 h)

NA: No aplica; ND: No detectada; <sup>a</sup>: Parámetros calculados a las 120 horas; <sup>b</sup>: Velocidad de consumo de la cafeína,  $V_{caf} [=]$   $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ; <sup>c</sup>: Velocidad de consumo de la fuente de carbono,  $V_{FC} [=]$   $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ .

El medio de cultivo F (sulfato de amonio y ácido tánico) presenta la mayor concentración de biomasa ( $2.85 \text{ g L}^{-1}$ ) que los demás medios, pero la concentración de biomasa de  $2.71 \text{ g L}^{-1}$  obtenida con el medio H (sulfato de amonio, cafeína, ácido tánico y sacarosa) no muestra diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) a la concentración obtenida con el medio F. Estos resultados de producción de biomasa son mayores a los reportados por Bhat *et al.*, (1997), quienes utilizaron una cepa de *A. niger* van Tieghem y reportaron una producción de biomasa de  $0.25 \text{ g L}^{-1}$ , utilizando una concentración de ácido tánico de  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Para una concentración de  $10 \text{ g L}^{-1}$  de ácido tánico, reportan una producción de biomasa de  $0.25 \text{ g L}^{-1}$ , ambos casos en un periodo de 7 días.

La mayor velocidad específica de crecimiento ( $0.044 \text{ h}^{-1}$ ) se observa utilizando el medio G (sulfato de amonio y sacarosa) pero en la Figura 7.4 se puede observar que a las 96 horas se presenta una fase estacionaria en la producción de biomasa, además la concentración de biomasa final es de  $1.79 \text{ g L}^{-1}$ . Los niveles de degradación de la cafeína y de la fuente de carbono, así como las velocidades de consumo de las mismas, son mayores utilizando el medio

de cultivo H, en el cual el 10% del nitrógeno total del medio y el 10% del carbono total del medio son proporcionados por fuentes de nitrógeno y carbono simples (sulfato de amonio y sacarosa). lo cual representa  $0.137 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio y  $3.413 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa. De los medios que contiene cafeína (D, E y H), el medio H, presentó una mayor actividad CD (0.1 U.I.) pero hay que recordar que éste medio de cultivo, también contenía ácido tánico y la actividad TAH máxima fue de 1.36 U.I. (Tabla 7.2).

Para una cepa de *Rhizopus oryzae*, Hadi *et al.*, (1994) reportan una actividad máxima a las 120 horas (2.9 U.I.) con  $30 \text{ g L}^{-1}$  de ácido tánico, mientras que Van de Lagemaat *et al.*, (1999) al utilizar una cepa de *P. commune* en un medio de cultivo líquido con una concentración de ácido tánico de  $50 \text{ g L}^{-1}$ , reportan una actividad TAH de 0.9 U.I. en un periodo de 150 horas.

Por otra parte, para una cepa de *A. tamarii* Hakil (1999) reporta una actividad CD de 0.25 U.I. utilizando un medio de cultivo con  $2 \text{ g L}^{-1}$  de cafeína.

Roussos *et al.*, (1994) reportan que la adición de nitrógeno mineral (sulfato de amonio,  $175 \text{ g L}^{-1}$ ) inhibe la degradación de la cafeína cuando *P. commune* V33A25 crece sobre pulpa de café en fermentación en medio sólido.

En cambio, Hakil *et al.*, (1999) utilizando una cepa de *A. tamarii*, observan que al adicionar a un medio con cafeína anhidra y sacarosa una concentración de  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio no modifica la velocidad de degradación de la cafeína, en fermentación en medio sólido y tampoco modifica la velocidad específica de crecimiento. Este fenómeno de inhibición no se observó en el presente trabajo, al adicionar  $0.137 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio.

Los resultados obtenidos, confirman aquellos obtenidos por Denis en 1996, quien reporta que la velocidad de degradación de la cafeína por *P. commune* V33A25, es acelerada cuando al medio con cafeína anhidra y sacarosa le adiciona sulfato de amonio en una concentración de  $1136 \text{ g L}^{-1}$ .

Es importante remarcar que se esperaba que en el medio E (cafeína y sacarosa), hubiera una mayor producción de biomasa que en el medio D (cafeína y ácido tánico), por consiguiente, un mayor consumo de la fuente de carbono y para el caso del medio E, se esperaba que se redujera la mayor actividad enzimática (Cafeín-desmetilasa). Pero sucedió lo contrario. La explicación puede ser la siguiente:

Para los experimentos del *Capítulo 6*, el hongo se había estado conservando en el *medio Ba* (infusión de café, con sacarosa y agar) al igual que se hizo con las resiembras, donde únicamente se inducía la actividad cafeín-desmetilasa. En los experimentos de este Capítulo, para poder inducir ambas actividades enzimáticas (CD y TAH), el hongo fue conservado en el *medio C* (infusión de café, con 10 % de ácido tánico y agar) y sobre ese mismo medio se hicieron las resiembras.

Esto nos lleva a pensar que el microorganismo produce enzimas para utilizar el mejor sustrato presente (sacarosa, para el *medio Ba* o ácido tánico, para el *medio C*).

Por otra parte, en los microorganismos los genes para la producción de varias enzimas, se encuentran normalmente inactivados en la ausencia del sustrato para la enzima. Esto es, que la producción de enzima esta normalmente reprimida. Sin embargo, cuando el sustrato es adicionado, el gen es encendido y la enzima es producida. A este proceso se denomina "inducción" o "represión" y la enzima es considerada "inducible" (Wang, 1979).

Lo anterior puede ser una posible explicación de los resultados obtenidos. En el *Capítulo 6*, cuando el microorganismo se encontraba en el *medio Ba*, únicamente se presentaba la expresión de la enzima cafeín-desmetilasa (para utilizar la cafeína como fuente de nitrógeno) y la enzima invertasa (para desdoblar la sacarosa como fuente de carbono). Cuando se cambia al *medio C* (*Capítulo 7*), debido a que no hay sacarosa en este medio de cultivo, el microorganismo no produce la enzima necesaria para utilizar esta fuente de carbono, no se encuentra inducida; más sin embargo produce la enzima necesaria para utilizar el ácido tánico como fuente de carbono del *medio C*).

Anteriormente, cuando se vuelve a cambiar la fuente de carbono de ácido tánico (*medio C*) a sacarosa (*medio E*), el microorganismo tiene que dejar de producir la enzima TAH, para producir la invertasa, pero esto requiere de un proceso de adaptación del microorganismo. Es posible que la producción de biomasa y el consumo de la fuente de carbono se ven disminuidas. Lo anterior es soportado por la teoría de Mwesigye y Barford (1996), quienes sugieren la presencia de un sistema de transporte de sacarosa que es inducido cuando las células han sido trasladadas sobre un medio con sacarosa.

#### 7.4. CAFEÍN-DESMETILASA (CD), ¿PRODUCTO ASOCIADO AL CRECIMIENTO?

Para saber si la producción de la enzima cafeín-desmetilasa (CD) está asociada o no asociado al crecimiento, consideramos la ecuación (8) propuesta por Luedeking y Piret (1959) para expresar la productividad de las fermentaciones ácido lácticas, este modelo es utilizado para cualquier fermentación en sistema agitado (Wang, 1979):

$$\frac{dE}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (8)$$

al dividir la ecuación (8) entre  $X$ , quedaria de la siguiente forma:

$$\frac{1}{X} \frac{dE}{dt} = \alpha \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} + \beta \quad (9)$$

Se sabe que

$$q_E = \frac{1}{X} \frac{dE}{dt} \quad \text{y} \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

y al sustituir en la ecuación (9), se obtiene la ecuación (10)

$$q_E = \alpha \mu + \beta \quad (10)$$

Es importante resaltar que la ecuación (10) sólo es válida en la parte de crecimiento exponencial del microorganismo.

Para calcular el valor de  $\mu$ , se propone el modelo de Gompertz (Draper y Smith, 1966).

$$X = X_{max} * e^{(-b * e^{-t/\tau})}$$

el cual permite una relación algebraica tiempo-producto (Saucedo-Castañeda y Gómez, 1989).

Para comparar los datos experimentales, con las predicciones del modelo, se utilizan datos normalizados. Los procedimientos para obtener los datos normalizado se detallan a continuación.

Los resultados se normalizaron, dividiendo cada concentración entre la concentración máxima real observada para cada parámetro. Por ejemplo, para normalizar los datos de biomasa obtenidos con el medio H, las concentraciones de biomasa se dividen entre 2.71 que es la producción de biomasa máxima con el medio H. De esta manera, se obtienen cinéticas de

crecimiento y de formación de producto cuyos valores están en el intervalo de 0 a 1 ( $0 \leq X \leq 1$  y  $0 \leq E \leq 1$ ). Los datos normalizados son adimensionales.

En la *Figura 7.6* se observa que los datos experimentales se ajustan muy bien al modelo de Gompertz, ya que el coeficiente de correlación tanto para la formación de biomasa como para la producción de la enzima, es de 0.99, lo cual indica que éste modelo, explica el 99% de la formación de la biomasa y la producción de enzima por el microorganismo.

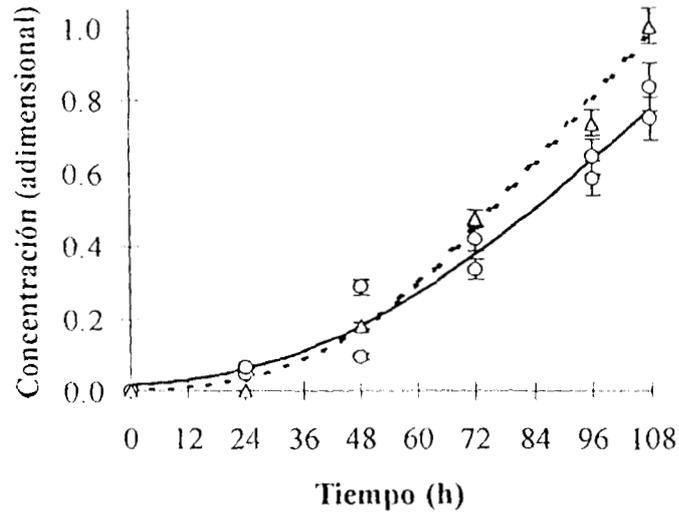
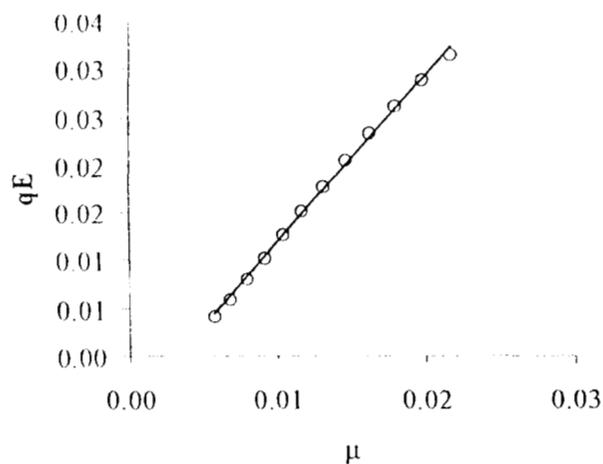


FIGURA 7.6. Comparación de la cinética experimental de concentración adimensional de biomasa (O) y enzima (Δ) contra los datos obtenidos mediante el modelo de Gompertz; biomasa (—) y enzima (···), utilizando el medio con cafeína, sulfato de amonio, ácido tánico y sacarosa (*medio H*).

Se grafica la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), contra la tasa específica de formación de producto ( $q_E$ ), para los datos calculados con el modelo de Gompertz y posteriormente se hace una regresión lineal de los puntos (*Figura 7.7*), la pendiente de la recta será la

contribución del crecimiento, mientras la ordenada al origen proporcionará la contribución no asociada al crecimiento.



**FIGURA 7.7.** Gráfica de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) contra la velocidad específica de formación de producto ( $q_E$ ), utilizando el medio con cafeína, sulfato de amonio, ácido tánico y sacarosa, medio H. (O) datos calculados con el modelo de Gompertz,  $R^2 = 0.99$ .

Como las variables adimensionales son las siguientes:

$$X^* = \frac{X}{X_{max}} \quad \text{y} \quad E^* = \frac{E}{E_{max}}$$

donde  $X^*$  = concentración de biomasa al tiempo  $t$  (adimensional)

$X$  = concentración de biomasa al tiempo  $t$  ( $\text{g L}^{-1}$ )

$X_{max}$  = concentración de biomasa máxima ( $\text{g L}^{-1}$ )

$E^*$  = concentración de enzima al tiempo  $t$  (adimensional)

$E$  = concentración de enzima al tiempo  $t$  (U.I.)

$E_{max}$  = concentración de enzima máxima (U.I.)

luego entonces el diferencial adimensional queda:

$$dX^* = \frac{1}{X_{max}^*} dX \quad \text{y} \quad dE^* = \frac{1}{E_{max}^*} dE$$

Sustituyendo en la ecuación (9):

$$\frac{E_{max}^*}{X^* X_{max}^*} \frac{dE^*}{dt} = \alpha \frac{X_{max}^*}{X^* X_{max}^*} \frac{dX^*}{dt} + \beta$$

Dividiendo entre  $\frac{X_{max}^*}{E_{max}^*}$

$$\frac{1}{X^*} \frac{dE^*}{dt} = \alpha \frac{X_{max}^*}{E_{max}^*} \frac{1}{X^*} \frac{dX^*}{dt} + \beta \frac{X_{max}^*}{E_{max}^*}$$

simplificando, la ecuación (10) en forma adimensional quedaría así:

$$(11)$$

En la *Tabla 7.3* se resumen los valores para los parámetros cinéticos de la ecuación de Luedeking y Piret en su forma dimensional (ecuación 10) y sustituyendo los valores dimensionales de  $X$  y  $E$  (ecuación 11), calculados a partir de la *Figura 7.7*.

**Tabla 7.3.** Coeficientes dimensionales y sustituyendo los valores adimensionales de  $X$  y  $E$  de la ecuación de Luedeking y Piret para la cafeína-desmetilasa formada por *P. commune* V33A25, en el medio de cultivo H

Coeficientes	$\alpha$	$\beta$	$\alpha^* \mu$
Sustituyendo $X^*$ y $E^*$	1.7708±0.0233	-0.0058±0.0003	0.0266
Dimensionales	45.8175	0.1501	0.6827

$$\mu [=] \text{h}^{-1}, \alpha [=] \text{U.I. gX}^{-1}, \beta [=] \text{U.I. h}^{-1} \text{gX}^{-1}$$

Al realizar una Análisis de Varianza (ANOVA) utilizando el paquete estadístico *Stat-graphics*® de los datos de la regresión lineal ( $q_E$  vs  $\mu$ ), obtiene que el valor de  $\beta = -0.0058$  no es estadísticamente significativo ( $\alpha = 0.01$ ).

Para el medio H,  $\beta$  estadísticamente no es significativo, por tanto se desprecia, con lo cual, se puede afirmar que la formación de producto (CD) por *Penicillium commune* V33A25,

utilizando el *medio H*, está totalmente asociada al crecimiento. La pendiente de la recta de regresión, es un estimado del coeficiente de rendimiento de producto con respecto a la biomasa.

#### 7.5. CONCLUSIÓN

El estudio de la influencia de la adición de fuentes de nitrógeno y carbono simples (sulfato de amonio y sacarosa, respectivamente) sobre la degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico por *Penicillium commune* V33A25, ha permitido conocer mejor la fisiología de este hongo filamentoso y establecer la relación entre la producción de biomasa y la producción de la enzima cafeín-desmetilasa.

El modelo de Gompertz, utilizado para calcular el valor de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) presenta un  $R^2=0.99$  para todos los medios evaluado.

La velocidad ( $\mu$ ) a la que el microorganismo crece, es muy dependiente de la naturaleza de las fuentes energía.

Inicialmente se observó que la cepa de *P. commune* V33A25 degrada el 27% de la cafeína inicial en un medio con ácido tánico (*medio D*), del ácido tánico inicial únicamente consumió el 26.3%.

Al sustituir el ácido tánico por sacarosa como fuente de carbono simple (*medio E*) el porcentaje de degradación del alcaloide aumento al 37% de la concentración inicial, pero el consumo de la fuente de carbono simple (sacarosa) solo fue del 16%.

En presencia de una fuente de nitrógeno simple (sulfato de amonio) y una fuente de carbono compleja (ácido tánico), el hongo produce en 120 horas, 2.85 g L<sup>-1</sup> de biomasa y consume el 51.8% de la fuente de carbono (*medio F*), pero al sustituir el ácido tánico por sacarosa (*medio G*), se observa nuevamente que el consumo de la sacarosa (fuente de carbono simple) solo es del 17%, hecho que refuerza la teoría del fenómeno de represión del ácido tánico sobre la enzima invertasa.

Cuando en el medio de cultivo se encuentran presentes  $0.137 \text{ g L}^{-1}$  de sulfato de amonio y  $3.413 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa (*medio H*), la producción de biomasa ( $2.71 \text{ g L}^{-1}$ ) es mayor que en los medios D, E y F. También presenta el mayor porcentaje de consumo de la fuente de carbono (67.6%) y el mayor índice de degradación de la cafeína (51%). Además la máxima actividad tanin-acil-hidrolasa es de 1.36 U.I. a las 72 horas y la máxima actividad cafeín-desmetilasa es de 0.10 U.I. a las 108 horas. Resultados que confirman la hipótesis planteada: "la presencia en el medio de una fuente de nitrógeno simple que aporte el 10% del nitrógeno total del medio y, la presencia de una fuente de carbono y energía simple que aporte el 10% del carbono total de medio de cultivo, mejorarán los niveles de degradación de la cafeína en presencia de ácido tánico". Debido a que los valores para dichos parámetros fueron considerablemente mayores que cuando se adiciona sacarosa al medio de cultivo.

Con el modelo propuesto por Luedeking y Piret se pudo determinar que la producción de la enzima cafeín-desmetilasa (CD), está *asociada al crecimiento*, esto relaciona el crecimiento celular a la formación de producto. Cuando las células o algunos constituyentes que son proporcionales a la masa celular se producen, entonces la velocidad de formación de producto se relaciona directamente con la velocidad de crecimiento.

*CAPÍTULO 8*

---

*CONCLUSIONES  
Y  
PERSPECTIVAS*

---

---

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

---

Uno de los subproductos más importante en la agroindustria del café, es la pulpa de café. La valorización de éste subproducto para la alimentación animal constituye una perspectiva bastante interesante, debido a su alto contenido de azúcares, proteínas y fibra. Pero la presencia de la cafeína, junto con los compuestos fenólicos son los responsables de la toxicidad de la pulpa de café debido a los efectos antifisiológicos y antinutricionales que producen, razón por la cuál la pulpa de café pierde su interés para ser usada como alimento animal.

El estudio bibliográfico muestra que la atención principal se ha centrado en la degradación de la cafeína presente en pulpa de café y/o en medio líquido, por hongos filamentosos, pero hasta el momento no se ha estudiado la degradación de éste alcaloide en presencia de ácido tánico, el cual es considerado como tanino hidrolizable. Lo cual permitió proponer el presente trabajo. En una primera etapa, diez cepas de hongos filamentosos fueron utilizadas para evaluar su velocidad de invasión sobre un sustrato preparado a partir de una infusión de pulpa de café con agar, utilizando dos métodos: crecimiento radial y crecimiento longitudinal. El género *Rhizopus* presentó una mayor velocidad de invasión del sustrato, pero únicamente las cepas de *Aspergillus oryzae* 2095, *Aspergillus oryzae* 2094, *Penicillium roqueforti* y *Penicillium commune* V33A25, también fueron capaces de crecer sobre un medio preparado a partir de infusión de café, lo cuál se consideró como una posibilidad para que éstas cepas presentaran capacidad para degradar la cafeína.

El hongo filamentosos que presentó el mayor porcentaje de degradación de la cafeína (96 %) presente en el medio preparado de infusión de café (*medio B*), fue *Penicillium commune* V33A25, mismo que presentó una  $VC_R$  y una  $VC_L$  promedio de 0.12 a 0.24 mm h<sup>-1</sup>. Por lo cual se considera que la velocidad de invasión del sustrato por el hongo, no está directamente relacionada con la capacidad de utilizar la cafeína.

Si la cepa con capacidad de degradar cafeína, *P. commune* V33A25, se requiere conservar por periodos cortos (meses), es conveniente utilizar el método de conservación I, el cual consiste en hacer crecer el microorganismo en un medio preparado a partir de una infusión de café con sacarosa y agar. De esta manera habrá un periodo de retardo corto en la degradación de la cafeína.

Si se quiere conservar a la cepa de *P. commune* V33A25, por periodos de tiempo prolongados (años), es conveniente conservarla a partir del método IV, el cual consiste en recolectar las esporas a partir del medio de infusión de café con agar (*medio Ba*) y posteriormente liofilizarlas.

Cuando se utiliza un medio de cultivo con sacarosa y cafeína con una relación de C/N de 50, la velocidad de degradación de cafeína aumenta y a las 48 horas se elimina el 96% de la concentración inicial del alcaloide, siempre y cuando el hongo sea reactivado en un medio con cafeína, sacarosa y agar (*medio Ba*).

Al resembrar *P. commune* V33A25 de un medio infusión de café con agar (*medio Ba*) a un medio de infusión de café con ácido tánico y agar (*medio C*) y finalmente se inocula un medio con sacarosa (*medio D* o *G*), se presenta posiblemente, un efecto de represión del ácido tánico sobre la invertasa.

En un medio con cafeína y ácido tánico (*medio D*), *P. commune* V33A25 es capaz de degradar el 27% de la cafeína inicial.

Si al *medio D*, se le adiciona  $0.137\text{g L}^{-1}$  de sulfato de amonio y  $3.413\text{g L}^{-1}$  de sacarosa, los niveles de degradación de la cafeína son del 51% y el consumo de la fuente de carbono es del 67.7% en un periodo de 120 horas.

La actividad enzimática cafeín-desmetilasa, de acuerdo al modelo de Luedeking y Piret, está asociada al crecimiento, cuando el microorganismo crece en el *medio H* (cafeína, sulfato de amonio, ácido tánico y sacarosa).

A lo largo de este trabajo de investigación se puede apreciar lo amplio que es el estudio de la fisiología microbiana. Ya que los microorganismos, en especial los hongos, tienen una capacidad de adaptación a una gran variedad de condiciones ambientales. Esta adaptación se acompaña de una reorganización de estructuras macromoleculares, de inducción y/o represión

de sistemas enzimáticos. Por tanto, se plantean las siguientes recomendaciones para futuros trabajos sobre el tema:

Con las evidencias que se han mostrado en este trabajo sobre el efecto de represión del ácido tánico sobre la invertasa, sería importante reforzar estos resultados realizando análisis de la actividad invertasa.

Con las condiciones de cultivo propuestas, sería interesante probar en un sistema de fermentación sólida, utilizando espuma de poliuretano como un sistema de fermentación inerte, para poder evaluar las actividades enzimáticas y la cuantificar de los compuestos y posteriormente una vez caracterizado el microorganismo bajo estas condiciones, pasar a un sistema de fermentación sólida utilizando pulpa de café, ya que como se mencionó anteriormente todas las investigaciones han sido enfocadas a la degradación de la cafeína únicamente, y no se han considerado los compuestos fenólicos. De esta manera se podría predecir con más precisión el comportamiento del microorganismo.

*CAPÍTULO 9*

---

*BIBLIOGRAFÍA*

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Abate, A. and Pfeffer, E. (1986) Changes in nutrient and performance by goats fed coffee pulp based diets followed by a commercial concentrate. *Animal Feed Science and Technology*, **1**: 1-10.
- Aguilar, C.N., Augur, C., Favela, E. and Viniegra-González, G. (1999) Production of fungal tannase by liquid and solid cultures. *Memorias del IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería*, pp. 14. Huatulco, Oax., México.
- Alexopoulos, C.J. and Mims, C.W. (1979) *Introductory mycology*. 3<sup>rd</sup> Edition. John Wiley & Sons, New York.
- Aoki, K., Shinke, R. and Nishira, H. (1976) Purification and some properties of yeast tannase. *Agr Biol Chem.*, **40**: 79-85.
- Aquiahuatl, R.M.A. (1992) Detoxificación de la pulpa de café: morfología, fisiología y bioquímica de hongos filamentosos que degradan la cafeína. *Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM. México*. 72 pp.
- Arnaud, M.J. (1987) The pharmacology of caffeine. *Progress in Drug Research*. **31**: 273-313.
- Arts, H.N. and Scazzocchio, C. (1985) Formal genetics and molecular biology of the control of gene expression in *Aspergillus nidulans*. In Bennett, J. and Lasure, L. (eds) *Gene manipulation in fungi*, pp. 309-343. Press, Inc., Orlando Fla.
- Asano, Y., Komeda, T. and Yamada, H. (1993) Microbial production of theobromine from caffeine. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57(8)**, 1286-1289.
- Association of Official Analytical Chemists (1987) Official Methods of Analysis. William Horwitz, Ed. AOAC. Washington, D.C.
- Bajpai, B. and Patil, S. (1996) Tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Trichoderma*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **12**: 217-220.

- Baumann, T.W., and Frischknecht, P.M. (1988) Caffeine production by plant (*Coffea spp.*) cell cultures. In Bajaj, Y.P.S. (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 4, pp. 264-281. Springer-Verlag, Berlin.
- Berthou, F., Damrong, R., Alix, D., Carlhant, D., Riche, C. and Guillouzo, A. (1988) Caffeine and theophylline in newborn and adult human hepatocytes; comparison with adult rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, **37**: 3691-3700.
- Beverini, M. and Metche, M. (1990). Identification, purification and physicochemical properties of tannase of *Aspergillus oryzae*. *Sciences des Aliments*, **10**: 808-816.
- Bhat, T.K., Makkar, H.P.S. and Singh, B. (1997) Preliminary studies on tannin degradation by *Aspergillus niger* van Tieghem MTCC 2425. *Letters in applied Microbiology*, **25**: 22-23.
- Blanch, H.W. (1981) Invited review: microbial growth kinetics. *Chem. Eng. Commun.*, **8**:181-211.
- Blecher, R. and Lingens, F. (1977) The metabolism of caffeine by *Pseudomonas putida* strain. *Hoepf-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**: 807-817.
- Bradfield, A.E. and Penny, M. (1948) The catechins of green tea. Part II. *J. Chem. Soc.*, pp. 2249-2254.
- Bressani, R. (1979) Antiphsiological factors in coffee pulp. In Braham, J.E and Bressani, R. (eds.) *Coffee pulp, composition, technology and utilization*, pp. 83-95. Ottawa, Ont., INDRC.
- Bressani, R., Estrada, E. and Jarquin, R. (1972) Pulpa y pergamino de café. I. Composición química y contenido de aminoácidos de la proteína de la pulpa de café. *Turrialba*, **22(3)**, 229-304.
- Cabezas, M.T., Flores, A. and Egaña, J.I. (1979) Use of coffee pulp in ruminant feeding. In Braham, J.E. and Bressani, R. (eds.) *Coffee pulp, composition, technology and utilization*, pp. 25-38. Ottawa, Ont., INDRC.
- Clarke, R.J. and Macrae, R. (1985) *Coffee*. Vol. 1. Elsevier Applied Science Publishers, London.
- Chang, S.I. and Fuller, H.L. (1964) Effect of tannin content of grain sorghums on their feeding value for growing chicks. *Poultry Science*, **53**: 30-36.

- Crawford, N.M. and Arts, H.N. (1993) The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genet.*, **27**: 115-146.
- Deacon, J.W. (1993) *Introducción a la microbiología moderna*, pp. 115-133. Limusa México.
- Delgado, V.F.K. (1999) Variación de la composición química de la pulpa de café sometida a procesos fermentativos. Tesis de Licenciatura en Química. Benemerita Univ. Auton. de Puebla. 56 p.
- Denis, S. (1996) Degradation de la caféine par *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp. Etude physiologique et biochimique. *PhD thesis, Université de Montpellier II, France*. 180 p
- Deschamps, A., Otuk, G. and Lebeault, J. (1983) Production of tannase and degradation of chestnut tannin by bacteria. *J Ferment Technol.*, **61**: 55-59.
- Deschamps, A.M. and Leulliette, L. (1984) Tannins degradation by yeast from barks. *International Biodeterioration*, **20(4)**, 237-241.
- Draper, N.R. and Smith, H. (1966) *Applied regression analysis*. John Wiley. New York.
- Dykerhoff, H. and Ambruster, R. (1933) Tannase. *Z. Phys. Chem.*, **292**: 38-56.
- Elías, L.G. (1978) Composición química de la pulpa de café y otros subproductos. In Bressani, R. and Braham, J.E. (eds.) *Pulpa de café, composición tecnología y utilización*, pp 23-24 INCAP. Guatemala.
- Elías, L.G. (1979) Chemical composition of coffee-berry by-products. In Braham, J.E. and Bressani, R. (eds.) *Coffee pulp, composition, technology and utilization*, pp. 11-24. Ottawa, Ont., INDRC.
- Flores, R.E., García-Burgos, M.V., Aquiahuatl, A. and Saucedo-Castañeda G. (1995). Aislamiento de cepas de hongos filamentosos a partir de la cepa. *Productos naturales Vol. 2 Perspectivas biotecnológicas*. 49-60
- Gaime, P.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 de Montpellier II, France*, 229 p.
- Galiotou-Panayaton, M. and Macris, B.J. (1986) Degradation of condensed tannins by *Calvatia gigantea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**: 502-506.

- García-Peña, I., Augur, C. and Favela-Torres, E. (1999) Purificación parcial de tanasa producida por *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido. In Prado, A., Huerta, S., Rodríguez, G. and Saucedo, G. (eds) *Avances en Purificación y Aplicación de Enzimas en Biotecnología*, pp. 247-261. Ediciones UAM-Iztapalapa, México.
- Gilbert, R.J. (1986) *Caffeine: The most popular stimulant*. Chelsea House, New York.
- Glück, M. and Lingens, F. (1987) Studies on the microbial production of theobromine and heteroxanthine from caffeine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**: 334-340.
- Goodwin, T. and Mercer, E. (1983) In *Introduction to plant Biochemistry* **1**, 529-566. Pergamon, New York.
- Grand, W.D. (1976) Microbial degradation of condensed tannins. *Science*, **193**:1137-1139.
- Gutiérrez-Sánchez G., Perraud-Gaime I., Augur C. and Saucedo-Castañeda G. (2000). Effect of conservation method on caffeine uptake by *Penicillium commune* V33A25. In Sera, T., Soccol, C.R., Pandey, A. and Roussos, S. (eds) *Coffe and Biotechnology Quality*, pp. 447-753. Kluwer, Dordrecht.
- Ilagerman, A.E. and Carlson, D.M. (1998) Biological responses to dietary tannins and other polyphenols. *Agricultural and Food Chem.*, **2**: 689-704.
- Ilakil, M. (1999) Dégradation de la caféine par les champignons filamenteux, purification et caractérisation d'une théophylline déméthylase d'*Aspergillus tamaritii*. *Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, France*, 150 p.
- Ilakil, M., Denis, S., Viniestra-González, G. and Augur C. (1998) Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**: 355-359.
- Ilakil, M., Voisinot, F., Viniestra-González, G. and Augur C. (1999) Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamaritii*: effects of additional nitrogen sources. *Process Biochemistry*, **35**: 103-109.
- Haslam, E. (1989) *Plant polyphenols*. Cambridge University Press, U.K.
- Hohloser, W., Osswald, B. and Lingens, F. (1980) Enzymological aspects of caffeine demethylation and formaldehyde oxidation by *Pseudomonas putida* C1. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **361**: 1763-1766.

- Hynes, M.J. and Davis, M.A. (1996) Regulation of acetamide catabolism. In Brambl, R. and Marzull, G.A. (eds) *The micota: biochemistry and molecular biology*, pp. 381-393. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany.
- Iibuchi, S., Minoda, Y. and Yamada, K. (1972) Hydrolyzing pathway, substrate specificity and inhibition of tannin acyl hydrolase. *Agr Biol Chem.*, **36**: 1553-1568.
- Inui, T., Takeda, Y. and Iizuka, H. (1965) Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **11**, suppl.
- James, J.E. (1991) *Caffeine and health*. Academic Press, London.
- Jong, B. and Birmingham, C. (1992) Current status of fungal culture collections. In Arora, D.K., Elander, R.P. and Mukerji, K.G. (eds) *Handbook of applied mycology, Vol. 4: Fungal Biotechnology*, pp. 1000-1018. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Kawakubo, J., Nishira, H., Aoki, K. and Shinke, R. (1991) Screening for gallic acid producing microorganisms and their culture conditions. *Agr Biol Chem.*, **55**: 857-877.
- Kumar, R. and Singh, M. (1984) Tannins: Their adverse role in ruminant nutrition. *J. Agric. Food Chem.*, **32**: 447-453.
- Kurtzman, R.H. and Schwommer, S. (1971) Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia*, **127**(4), 481-482.
- Lekha, P. and Lonsane, B. (1994) Comparative titres, location y properties of tannin acyl hidrolase produced by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Proc Biochem.*, **29**: 497-503
- Lekha, P. and Lonsane, B. (1997) Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv Appl Microbiol.*, **44**: 215-260.
- Lewis, J.A. and Starkey, R.L. (1969) Decomposition of plant tannins by some soil microorganisms. *Soil Sci.*, **107**: 235-241.
- Luck, G., Murray, N.J., Grimmer, H.R., Warminski, E.E., Williamson, M.P., Lilley, T.H. and Haslam, E. (1994) Polyphenols, astringency, and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, **37**: 357-371.
- Luedeking, R. and Piret, E.L. (1959) Transient and steady states in continuous fermentation, theory and experiment. *J Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, **1**: 431-459

- Madhavakrishna, W., Bose, S. and Nayudamma, Y. (1960) Estimation of tannase and certain oxidising enzymes in indian vegetables tanstuffs *Bull Cent Leath Res Inst.*, **7**: 1-11.
- Marzulf, G.A. (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and molecular biology reviews*, **61**: 17-32.
- Meneses, M.M. (1998) Caracterización e identificación bioquímica de un producto de fermentación sólida, con actividad probiótica *Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.*
- Middelhoven, W.J. and Bakker, C.M. (1982) Degradation of caffeine by immobilized cells of *Pseudomonas putida* strain C 3024. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **15**: 214-217.
- Moguel, P. and Toledo, V. (1999) El café en México: Ecología, cultura indígena y sustentabilidad. *El Jarocho verde* **11**: 3-12.
- Mulcandani, A. and Luong, J.H.T. (1989) Microbial inhibition kinetics revisited. *Review. Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 66-73.
- Murray, N.J., Williamson, M.P., Lilley, T.H. and Haslam, E. (1994) Study of the interaction between salivary proline-rich proteins and a polyphenol by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.*, **219**: 923-935.
- Mwesigye, P.K. and Barford, J. P. (1996) Mechanism of sucrose utilisation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **42**: 297-306.
- Nierenstein, M. (1936) Experimental work on tea tannin. *Analyst*, **61**: 294-295.
- Nishira, H. and Joslyn, M. (1968) *Phytochem* **7**: 2147-2156.
- Polasco, M. (1985) *Café y sociedad en México*. Centro de Ecodesarrollo, México, D.F.
- Phons, A.H.S., Allsopp, D. and Eggins, H.O.W. (1981) *Smith's introduction to industrial mycology*. 7<sup>th</sup> Edition. Edward Arnold, London.
- Port, J. (1975) *Principles of microbe and cell cultivation*. Blackwell Scientific Publications. London.
- Rajakumar, G. and Nandy, S. (1983) Isolation, purification and some properties of *Penicillium chrysogenum* tannase. *Appl Environ Microbiol* **46**: 525-527.
- Sureau-Guyon, P. (1968) *Les composés phénoliques des végétaux*. Dunod, Paris.

- Roussos, S., Aquihuatl, M.A., Trejo-Hernández, M.R., Perraud-Gaime, I., Favela E., Ramakrishna M., Rimbault M. and 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.
- Roussos, S., Hannibal, L., Aquihuatl, M.A., Trejo Hernández, M.R. and Marakis, S. (1994) Caffeine degradation by *Penicillium verrucosum* in solid state fermentation of coffee pulp: critical effect of additional inorganic and organic nitrogen sources. *J. Food Sci. Technol.*, **31**(4), 316-319.
- Sagar (1999) [www.sagar.gob.mx](http://www.sagar.gob.mx)
- Saucedo-Castañeda, G. and Gómez, J. (1989) The effect of glucose and ammonium sulfate on kinetic acidification by heterogeneous mixed culture. *Biotech. Lett.*, **11**(2), 121-124.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**(12), 3875-3883.
- Scazzocchio, C. and Darlington, A.J. (1968) The induction and repression of the enzymes of purines breakdown in *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **166**: 557-568.
- Schipper, M.A.A. and Stalpers, J.A. (1984) A revision of the genus *Rhizopus*. *C.B.S. Stud. Mycol.* 25.
- Schwimmer, S. and Kurtzman, R.H. (1972) Fungal decaffeination of roast coffee infusions. *J. Food Sci.*, **37**: 921-924.
- Schwimmer, S., Kurtzman, R.H. and Heptmann, E. (1971) Caffeine metabolism by *Penicillium roquefortii*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **140**: 109-113.
- Skene, I. and Brooker, J. (1995) Characterisation of tannin acylhydrolase activity in the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Anaerobe*, **1**: 321-327.
- Smith, D. (1991) Filamentous fungi. Maintenance of filamentous fungi. In Kirsop, B. E. and Doyle, A. (eds) *Maintenance of microorganisms and cultured cells*. Academic Press, Great Britain.
- Smith, G. (1962) *Introducción a la microbiología Industrial*. Acribia, España.
- Smith, J.E. (1994) *Biotechnology handbooks*. Vol. 7. Plenum Press, New York.
- Smith, J.E. and Berry, D.R. (1975) *The filamentous fungi*. Vol. 1. Edward Arnold, London.

- Sourlangas, S. (1947) Enzymes in the pyrogallol tannins and the decomposition products yielded. *J Int Soc Leath Trades Chemist.*, **31**: 13-23.
- Stavric, B. (1988a) Methylxanthines: Toxicity to humans. 2. Caffeine. *Food Chem. Toxic.*, **26**(7), 645-662.
- Stavric, B. (1988b) Methylxanthines: Toxicity to humans. 3. Theobromine, paraxanthine and the combined effects of methylxanthines. *Food Chem. Toxic.*, **26**(8), 725-733.
- Suzuki, T. and Waller, G.R. (1988) Metabolism and analysis of caffeine and other methylxanthines in coffee, tea, cola, guarana and cacao. In Linskens H.F., Jackson J.F. (eds) *Modern methods of plant analysis*. Vol. 8, pp, 184-200. Springer-Verlag, Berlin.
- Suzuki, T. and Waller, G.R. (1989) Caffeine metabolism by *Coffea arabica* L. fruit. *13<sup>e</sup> Coll. Sci. Int. Sur le Café*, Asic, Paipa.
- Trinci, A.P.J. (1969) A kinetic study of growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. Gen. Microbiol.*, **57**: 11-24.
- Van de Lagemaat J., Augur C. and Pyle, D. L. (1999) Screening of filamentous fungi for the production of extracellular tannase in solid-state fermentation (SFF). *III Seminar International on Biotechnology and Agroindustry of Coffee*. Poster session, C06. Londrina, PA, Brasil.
- Van Soest, P.J. (1994) *Nutritional ecology of the ruminants*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Vargas, E., Cabezas, M.T., Murillo, B., Braham, E.J. and Bressani, R. (1982) Efecto de altos niveles de pulpa de café deshidratada sobre el crecimiento y adaptación de novillos juvenes. *Arch. Latinoam. de Nutr.*, **12**: 973-989.
- John, P., Kratzer, C.H. and Josly, M.A. (1966) The growth depressing and toxic effect of tannins to chicks. *Poultry Science*, **45**: 135-142.
- Ang, D.L., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunill, P., Humphrey, A.E. and Lilly M.D. (1979) *Fermentation and enzyme technology*. John Wiley & Sons USA.
- Waterman, P. and Mole, S. (1994) *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- White, T. (1957) Tannins their occurrence and significance. *J. Sci. Food Agric.*, **8**: 377-384.

- Woolfolk, C.A. (1975) Metabolism of N-Metilpurines by a *Pseudomonas putida* strain isolated by enrichment on caffeine as the sole source of carbon and nitrogen. *J. of bacteriol.* 123(3), 1088-1106
- Yamada, K. and Tanaka, T. (1972) Winemaking using Tannase in the fermentation process. Patent Ger. Offen. 2,224,100. (CL. 12 g) 30, Nov. 1972, Japan Appl. 71,33,151.
- Zuluaga, V.J. (1981) Contribution a l'étude de la composition chimique de la pulpe de café (*Coffea arabica* L.). *Thèse de Doctorat en Science, Faculté des Sciences, Université. Neuchâtel, Suisse*, 93 p.
- Zuluaga, V.J. (1989) Utilización de los subproductos del café. In Roussos, S., Licona F.R and Gutiérrez R.M (comp) *Memorias del I Seminario internacional sobre biotecnología en la agroindustria cafetalera*, pp, 63-76 Del 12-15 de Abril de 1989, Xalapa, Veracruz, México.

*ANEXOS*

# LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1.	Producción mundial de café para la cosecha 1997-98 .....	7
FIGURA 2.2.	Representación química de cafeína y sus derivados desmetilados .....	10
FIGURA 2.3.	Metabolismo de la cafeína en el café y en el té .....	14
FIGURA 2.4.	Metabolismo de la cafeína en el hombre .....	16
FIGURA 2.5.	Vía de degradación de la cafeína en <i>Pseudomonas putida</i> .....	18
FIGURA 2.6.	Degradación de la cafeína por los hongos filamentosos .....	20
FIGURA 2.7.	Ejemplos de taninos hidrolizables .....	23
FIGURA 2.8.	Ejemplos de taninos condensados (proantocianidinas) .....	24
FIGURA 2.9.	En la reacción de hidrólisis de una mol de ácido tánico (tanino hidrolizable) se libera una mol de glucosa y de 7 a 9 moles de ácido gálico, dependiendo del grado de sustitución. R <sub>1</sub> , galoil y R <sub>2</sub> , digaloil ..	29
FIGURA 4.1.	a) Inoculación por piquete de las cajas de Petri .....	
	b) División de las cajas de Petri y medición del crecimiento radial .....	42
FIGURA 4.2.	Inoculación y lectura del crecimiento longitudinal .....	43
FIGURA 4.3.	Tratamiento de las muestras para evaluar la capacidad de degradación de la cafeína y el método de conservación .....	46
FIGURA 4.4.	Tratamiento de las muestras para evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno y carbono sobre la capacidad de degradación de cafeína .....	47
FIGURA 4.5.	Diagrama de flujo de la estrategia seguida en el presente trabajo .....	58
FIGURA 5.1.	Crecimiento radial en el medio PDA y en el <i>medio Aa</i> , de las cepas de hongos estudiadas .....	62
FIGURA 5.2.	Crecimiento longitudinal en el medio PDA y en el <i>medio Aa</i> para los diferentes hongos estudiados .....	63
FIGURA 5.3.	Concentración de cafeína y producción de biomasa al final de 72 horas de fermentación. Medio infusión pulpa de café ( <i>medio A</i> ) .....	67

<b>FIGURA 5.4.</b>	Concentración de cafeína y producción de biomasa al final de 72 horas de fermentación. Medio de infusión de café ( <i>medio B</i> ).....	68
<b>FIGURA 5.5.</b>	Porcentaje de degradación de la cafeína por <i>P. commune</i> V33A25 después de 72 horas .....	70
<b>FIGURA 6.1.</b>	Influencia del método de conservación y adaptación sobre la capacidad de <i>P. commune</i> V33A25 para degradar la cafeína. Cepa conservada con el <i>método I</i> , con el <i>método II</i> , <i>método III</i> , y <i>método IV</i> .....	76
<b>FIGURA 6.2.</b>	Consumo de cafeína y sacarosa por <i>P. commune</i> V33A25, conservada con el <i>método I</i> . El medio de cultivo contiene cafeína anhidra en una relación C/N de 50 .....	79
<b>FIGURA 7.1.</b>	Producción de biomasa por <i>Penicillium commune</i> V33A25. Medio con cafeína y ácido tánico, <i>D</i> ; medio con cafeína y sacarosa, <i>E</i> . El medio <i>H</i> , contiene fuentes de nitrógeno y carbono mixtas .....	86
<b>FIGURA 7.2.</b>	Consumo de la fuente de carbono y producción de la actividad TAH por <i>Penicillium commune</i> V33A25. Medio con cafeína y ácido tánico, <i>D</i> ; medio con cafeína y sacarosa, <i>E</i> ; medio mixto, <i>H</i> .....	87
<b>FIGURA 7.3.</b>	Consumo de la fuente de nitrógeno y producción de la actividad CD, por <i>Penicillium commune</i> V33A25. Medio con cafeína y ácido tánico, <i>D</i> ; medio con cafeína y sacarosa, <i>E</i> ; medio mixto, <i>H</i> .....	88
<b>FIGURA 7.4.</b>	Producción de biomasa por <i>Penicillium commune</i> V33A25. Medio con sulfato de amonio y ácido tánico, <i>F</i> ; medio con sulfato de amonio y sacarosa, <i>G</i> y medio mixto, <i>H</i> .....	90
<b>FIGURA 7.5.</b>	Consumo de la fuente de carbono y producción de la actividad tanasa por <i>Penicillium commune</i> V33A25. Medio con sulfato de amonio y ácido tánico, <i>F</i> ; medio con sulfato de amonio y sacarosa, <i>G</i> y medio mixto, <i>H</i> . .....	92
<b>FIGURA 7.6.</b>	Comparación de la cinética experimental de biomasa y enzima contra los datos obtenidos mediante el modelo de Gompertz; utilizando el medio con cafeína, sulfato de amonio, ácido tánico y sacarosa ( <i>medio H</i> ) ....	97
<b>FIGURA 7.7.</b>	Gráfica de la tasa específica de crecimiento contra la tasa específica de formación de producto, utilizando el medio con cafeína, sulfato de amonio, ácido tánico y sacarosa ( <i>medio H</i> ) .....	98

# LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1.	Composición química de la pulpa de café fresca .....	8
Tabla 2.2.	Contenido de otros compuestos en la pulpa de café .....	9
Tabla 2.3.	Solubilidad de la cafeína en diferentes solventes en función de la temperatura .....	11
Tabla 4.1.	Clave de identificación, nombre y procedencia de los hongos filamentosos utilizados en este estudio .....	36
Tabla 4.2.	Medios de cultivos empleados para evaluar el crecimiento radial y longitudinal ( <i>medio Aa</i> ), la capacidad de degradación de cafeína ( <i>medio Ba</i> ) y medio de conservación para evaluar el efecto de las fuentes de Nitrógeno y Carbono ( <i>medio C</i> ) .....	37
Tabla 4.3.	Medios de cultivos empleados para evaluar la degradación de cafeína en presencia de ácido tánico y el efecto de la adición de una fuente Nitrógeno y Fuente de Carbono, simples .....	38
Tabla 4.4.	Curva patrón de ácido tánico, sacarosa o mezcla de ácido tánico y sacarosa	51
Tabla 5.1.	Velocidad de crecimiento radial y longitudinal y coeficiente de correlación ( $R^2$ ) entre el crecimiento radial ( $C_R$ ) y el crecimiento longitudinal ( $C_L$ ) sobre el medio de infusión de pulpa de café con agar ( <i>medio Aa</i> ) .....	65
Tabla 6.1.	Retardo en el inicio de la degradación de la cafeína, velocidad y porcentaje de degradación la cafeína por <i>Penicillium commune</i> V33A25, utilizando cuatro métodos de conservación e inducción .....	77
Tabla 7.1.	Porcentaje de Nitrógeno y Carbono que aportó cada molécula al medio de cultivo. Fuente de Nitrógeno (FN) y Fuente de Carbono (FC) .....	84
Tabla 7.2.	Parámetros cinéticos, relacionados al catabolismo y metabolismo de <i>Penicillium commune</i> V33A25, en los diferentes medios de cultivo utilizados	93
Tabla 7.3.	Coefficientes de la ecuación de Luedeking y Piret para la cafeín-desmetilasa formada por <i>P. commune</i> V33A25, en el medio de cultivo II .....	99

# ABREVIACIONES, SÍMBOLOS Y UNIDADES

## CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
GRAS	Generally Recognized As Safe
FDA	Food and Drug Administration
AO-2095	<i>Aspergillus oryzae</i> 2095
AO-2094	<i>Aspergillus oryzae</i> 2094
AN-2088	<i>Aspergillus niger</i> 2088
RO-2339	<i>Rhizopus oryzae</i> 2339
RO-2340	<i>Rhizopus oryzae</i> 2340
PC-2267	<i>Penicillium camemberti</i> 2267
AN	<i>Aspergillus niger</i>
PR	<i>Penicillium roqueforti</i>
PV33A25	<i>Penicillium commune</i> V33A25
A.	<i>Aspergillus</i>
R.	<i>Rhizopus</i>
P.	<i>Penicillium</i>
Medio A	Medio de cultivo líquido, preparado a partir de una infusión de pulpa de café
Medio Aa	Medio de cultivo, prepara a partir de una infusión de pulpa de café con agar
Medio B	Medio de cultivo líquido, preparado a partir de una infusión de café con sacarosa
Medio Ba	Medio de cultivo, preparado a partir de una infusión de café con sacarosa y agar
Medio C	Medio de cultivo líquido, preparado a partir de una infusión de café con ácido tánico y agar
Medio D	Medio de cultivo líquido con cafeína y ácido tánico
Medio E	Medio de cultivo líquido con cafeína y sacarosa
Medio F	Medio de cultivo líquido con sulfato de amonio y ácido tánico
Medio G	Medio de cultivo líquido con sulfato de amonio con sacarosa
Medio H	Medio de cultivo líquido con cafeína, sulfato de amonio y ácido tánico, sacarosa (Medio mixto)

## MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y ADAPTACIÓN DE CEPAS

<i>Método I</i>	Método de conservación I, consiste en conservar la cepa en un medio de infusión de café con sacarosa
<i>Método II</i>	Método de conservación II, consiste en conservar la cepa en un medio de infusión de pulpa de café
<i>Método III</i>	Método de conservación III, consiste en recolectar las esporas a partir del medio agar papa dextrosa (PDA) y posteriormente liofilizadas
<i>Método IV</i>	Método de conservación IV, consiste en recolectar las esporas a partir del medio infusión de café con sacarosa ( <i>medio Ba</i> ) y posteriormente liofilizadas
<i>PDA</i>	Medio Agar-Papa-Dextrosa

## ABREVIACIONES

<i>ACD</i>	Actividad Cafeín-desmetilasa, expresada en $\mu\text{mol}$ de cafeína consumida por mililitro por minuto (UI)
<i>ARN</i>	Acido Ribonucléico
<i>ATAH</i>	Actividad Tanin-acil-hidrolasa, expresada en $\mu\text{mol}$ de cafeína consumida por mililitro por minuto (UI)
<i>CN</i>	Relación carbono, nitrógeno. Numero de átomos de carbono de la fuente de carbono, sobre el numero de átomos de nitrógeno de la fuente de nitrógeno
<i>CD</i>	Cafeín desmetilasa
$C_{\text{final}}$	Concentración final de cafeína en la muestra, analizada por HPLC, $\text{mg L}^{-1}$
$C_{\text{inicial}}$	Concentración inicial de cafeína en la muestra blanco, analizada por HPLC, $\text{mg L}^{-1}$
<i>D</i>	Factor de dilución de la muestra para análisis en HPLC
<i>DLT</i>	<i>DL</i> -ditiotreitól
<i>E</i>	Factor de dilución de la muestra, durante la reacción enzimática
<i>EBe</i>	Extracto bruto extracelular
<i>EBi</i>	Extracto bruto intracelular
<i>EM</i>	Matraz Erlen meyer
<i>FC</i>	Fuente de carbono
<i>FN</i>	Fuente de nitrógeno
$G_{\text{final}}$	Concentración final de ácido gálico en la muestra blanco, analizada por HPLC, $\text{mg L}^{-1}$
$G_{\text{inicial}}$	Concentración inicial de ácido gálico en la muestra, analizada por HPLC, $\text{mg L}^{-1}$
<i>HPLC</i>	High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía de Líquidos de Alto Presión)
$P_f$	Peso final del papel filtro con muestra, g
$P_i$	Peso inicial del papel filtro sin muestra, g

<i>PM</i>	Peso molecular, $\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$
<i>TAH</i>	Tanin-acil-hidrolasa
<i>TCA</i>	Ácido tricloroacético
<i>Tr</i>	Tiempo de reacción, $\text{min}^{-1}$
<i>V<sub>caf</sub></i>	Tasa volumétrica de consumo de la cafeína, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
<i>V<sub>FC</sub></i>	Tasa volumétrica de consumo de la Fuente de Carbono, $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$
<i>V<sub>CL</sub></i>	Velocidad de crecimiento longitudinal, $\text{mm h}^{-1}$
<i>V<sub>CR</sub></i>	Velocidad de crecimiento radial, $\text{mm h}^{-1}$
<i>V<sub>extr</sub></i>	Volumen del extracto intracelular o extracelular, mL
<i>V<sub>r</sub></i>	Volumen de reacción, L
<i>ΔC</i>	Cafeína consumida, $\mu\text{g L}^{-1}$
<i>ΔG</i>	Ácido gálico liberado, $\text{mg L}^{-1}$

### UNIDADES

$^{\circ}\text{C}$	Grados celcius
<i>cm</i>	centímetros
<i>esporas mL<sup>-1</sup></i>	esporas por mililitro
$\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$	gramos por litro por hora
$\text{g L}^{-1}$	gramos por litro
<i>g</i>	gramos
<i>h</i>	hora
$\text{h}^{-1}$	horas a la menos 1
<i>L</i>	Litros
<i>M</i>	Molar
$\text{mg L}^{-1}$	miligramos por litro
<i>mg</i>	miligramos
$\text{mL min}^{-1}$	mililitros por minuto
<i>mL</i>	mililitros
$\text{mm h}^{-1}$	milímetros por hora
<i>mm</i>	milímetros
<i>mM</i>	miliMolar
<i>N</i>	Normal

<i>nm</i>	nanómetros
<i>p:v</i>	relación peso, volumen
<i>rpm</i>	revoluciones por minuto
<i>UI</i>	Unidades Internacionales
<i>v:v</i>	relación volumen, volumen
$\mu\text{g L}^{-1}$	microgramos por litro
$\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$	microgramos por micromoles
$\mu\text{l}$	microlitros
$\mu\text{m}$	micrometros
$\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$	micromoles por mililitro por minuto
$\mu\text{mol}$	micromoles

### SÍMBOLOS

$\lambda$	longitud de onda
$\alpha$	coeficiente de formación de producto asociada al crecimiento, $\text{UI gX}^{-1}$
$\beta$	coeficiente de formación de producto no asociada al crecimiento, $\text{UI gX}^{-1}$
$E$	concentración de producto (enzima), $\text{UI}$
$t$	tiempo
$R^2$	Coefficiente de correlación, adimensional
$r_p$	tasa específica de formación de producto, $\text{UI gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$
$\mu$	velocidad específica de crecimiento, $\text{h}^{-1}$
$X$	concentración de biomasa, $\text{g L}^{-1}$
$X_{\text{máx}}$	concentración de biomasa máxima (observada), $\text{g L}^{-1}$
$X_0$	concentración de biomasa, $\text{g L}^{-1}$

---

**CAPITULOS EN LIBROS**

- **G. Gutiérrez-Sánchez, I Perraud-Gaime, C. Augur, J.M. Romano-Machado and G. Saucedo-Castañeda (2000).** Effect of strain conservation method on caffeine degradation by *Penicillium commune* V33A25. In *Coffee Biotechnology and Quality*. A. Pandey and S. Roussos (ed). Kluwer, Dordrecht, pp. 447-753

**CONGRESOS INTERNACIONALES**

- **Gutiérrez Sánchez G., Romano-Machado J. M., Augur C., Perraud-Gaime I. y Saucedo Castañeda G. (1999).** Evaluación de la actividad cafeinasa de *Penicillium sp.* V33A25 en relación al método de conservación. **III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agroindustry. Londrina, Paraná, BRASIL.**

**CONGRESOS NACIONALES**

- **Gutiérrez Sánchez G., Augur C., Perraud-Gaime I. y Saucedo Castañeda G. (1999).** Influencia del método de conservación e inducción en la capacidad de degradación de cafeína de *Penicillium sp.* V33A25. **VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Bahías de Huatulco, Oaxaca.**
- **Gutiérrez Sánchez G., Augur C., Perraud-Gaime I. y Saucedo Castañeda G. (1999).** Comparación de dos métodos para la selección de cepas para su uso en Fermentaciones en Medio Sólido: Crecimiento radial y longitudinal. **VIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, IV Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería. Bahías de Huatulco, Oaxaca.**

EFFECT OF CONSERVATION METHOD ON CAFFEINE UPTAKE  
BY *PENICILLIUM COMMUNE* V33A25

G. Gutiérrez-Sánchez<sup>1</sup>, I. Perraud-Gaime<sup>2</sup>, C. Augur<sup>2</sup>, J.M. Romano-Machado<sup>1</sup>, G. Saucedo-Castañeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAMI), A. P. 55-535, C. P. 09340, México, D. F., Mexico; <sup>2</sup>Institut de Recherche pour le Développement-México (IRD-México), Cicerón 609, Los Morales, C. P. 11530, México, D. F., Mexico

Running title: Caffeine degradation

1. Introduction

Coffee pulp is one of the major by-products obtained during the pulping operation of coffee cherries. A fraction of this material is used for compost production for coffee plant nurseries and other part is spilt in rivers or piled up near them. For every two tons of coffee cherry processed, nearly one ton of pulp is generated. During the 1997-98 period, 10.4 million of sacks (60 kg each) of fresh coffee pulp were produced in Mexico (Barreiro, 1999). Coffee pulp is rich in proteins, minerals and fibre that can be used for animal feeding, but utilization of coffee pulp for feed is constrained by anti-physiological (caffeine) and anti-nutritional (polyphenols) compounds (Roussos *et al.*, 1989). These compounds cause adverse effects on the animals that consume coffee pulp. Caffeine (1,3,7-trimethylxanthine, Figure 1) concentration varies according to the coffee variety (0.9-2.4% dry wt. basis). Its physiological role is probably to defend coffee plants from predators and to inhibit growth of other plants. In humans, caffeine is demethylated into three primary metabolites: theophylline, theobromine, and paraxanthine. At 100 mg kg<sup>-1</sup> theophylline is toxic to rats. Theobromine has been related with headache, insomnia, restlessness, excitement, mild delirium, muscle tremor, tachycardia and extrasystoles in man and caffeine has been reported to have many other activities including mutagenic, teratogenic and carcinogenic capacities (Denis 1996).

447

In *Coffee Biotechnology and Quality*, Sera T., Soccol C.R., Pandey A., Roussos S. (eds) Kluwer, Dordrecht pp. 447-453

INFLUENCIA DEL MÉTODO DE CONSERVACIÓN E INDUCCIÓN, EN LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE CAFEÍNA DE *Penicillium sp.* V33

Gerardo Gutiérrez-Sánchez, Gerardo Saucedo-Castañeda, Isabelle Gaime-Perraud<sup>1</sup>, y Christopher Augur<sup>1</sup>  
 Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, AP 55-535  
 Av. Michoacán y La Purísima S/N, Iztapalapa, México, D.F., MEXICO  
 Fax (5)723-63-55, e-mail: ggs@xanum.uam.mx  
<sup>1</sup>IRD-México, Institut de Recherche pour le Développement, FRANCIA

Palabras clave: cafeína, degradación, inducción

**Introducción.** La pulpa de café es un subproducto agrícola abundante en México y América Latina y es rica en nutrientes. Se obtiene durante la operación de despulpeo de las cerezas de café. Sin embargo, su aprovechamiento en la alimentación animal se reduce notablemente debido a la presencia de compuestos tóxicos, difíciles de degradar, tales como cafeína, fenoles, taninos, ácidos clorogénicos, cafeico y tanico (1). Una de las alternativas que se proponen para la utilización de la pulpa de café, es ensilarla y posteriormente detoxificarla empleando hongos filamentosos.

El objetivo de este trabajo es conocer si una vez expresada la capacidad de degradación de cafeína ésta se encuentra influenciada por el método de conservación de la cepa de *Penicillium sp.* V33.

**Metodología.** La cepa de *Penicillium sp.* V33 utilizada en este estudio pertenece a la colección IRD-UAM (1) y fue seleccionada por su capacidad de degradar cafeína. Los medios de activación empleados fueron los siguientes: MPCA, medio infusión de pulpa de café y agar; MPC, medio infusión de pulpa de café; MCA, medio infusión de café molido y agar; MC, medio infusión de café molido (2, 3).

**Resultados y Discusiones.** En la Figura 1, se aprecia la degradación de cafeína obtenida empleando los diferentes métodos de conservación propuestos. Cuando la cepa fue conservada en MCA, presentó una velocidad de degradación de cafeína de  $0.0116 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , la cual comenzó a las 12 hr; cuando se conservó en MPCA, hubo una degradación del 39 % a las 72 horas, pero fue necesario hacer un total de 6 resembras para alcanzar una tasa de degradación similar ( $0.0095 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) a la presentada cuando se conservó en MCA. Con esporas obtenidas en MCA y liofilizadas, la degradación comienza a las 36 horas y cuando se cosechan a partir de PDA se observa que la cepa comienza a degradar tardíamente la cafeína a las 60 horas. Hakil (3) trabajó empleando el método MCA, obteniendo una degradación de cafeína mayor al 90 % después de 80 horas incubación. Cabe mencionar que no existen reportes en el que se indique que la enzima responsable de la degradación de la cafeína sea inducible.

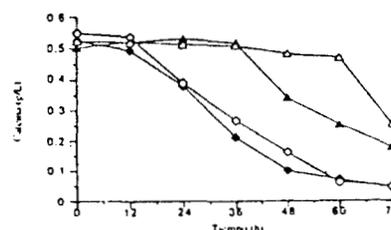


Figura 1. Influencia de método de conservación sobre la capacidad de degradación de cafeína de *Penicillium sp.* V33. (●) Conservada sobre MCA; (○) conservada sobre MPCA y posteriormente sobre MCA; (▲) esporas cosechadas sobre MCA y liofilizadas; (△) esporas cosechadas sobre PDA y liofilizadas.

**Conclusiones.** Los resultados de este estudio, sugieren que la actividad enzimática responsable de la degradación de la cafeína es inducible y una vez expresada dicha actividad es importante conservar la cepa en medio que contenga al menos una concentración de 0.5 g/L de cafeína.

**Agradecimientos.** Apoyo financiero a IC 18°C7970185.

#### Bibliografía.

- Roussos, S., Aquihuatl, M. A., Trejo-Hernández, M. R., Perraud-Gaime, I., Favela, E., Ramakrishna, M., Rainbault, M., Viniestra-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.
- Denis S. (1996) Dégradation de la caféine par *Aspergillus sp.* et *Penicillium sp.* Etude physiologique et biochimique. *PhD thesis, Université de Montpellier II, France*, pp 209.
- Hakil, M., Denis, S., Viniestra-González, G. and Augur, C. (1998) Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 22:355-359.

## COMPARACION DE DOS METODOS PARA LA SELECCIÓN DE CEPAS PARA SU USO EN FERMENTACIONES EN MEDIO SOLIDO: CRECIMIENTO RADIAL Y LONGITUDINAL

Gerardo Gutiérrez-Sánchez, Gerardo Saucedo-Castañeda, Isabelle Gaimé-Perraud<sup>2</sup>, y Christopher Augur<sup>1</sup>  
 Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, AP 55-535  
 Av. Michoacán y La Purísima S/N, Iztapalapa, México, D.F. MEXICO  
 Fax (5)723-63-55, e-mail: ggs@xanum.uam.mx  
<sup>1</sup>IRD-México, Institut de Recherche pour le Développement. FRANCIA

Palabras clave: selección, crecimiento, pulpa de café

**Introducción.** La medición de la velocidad de crecimiento en hongos filamentosos, indica la capacidad del microorganismo para colonizar algún sustrato empleado en procesos de fermentación en medio sólido. El crecimiento radial y longitudinal son dos métodos propuestos para evaluar la capacidad de los hongos para invadir y adaptarse a los nutrientes sobre un sustrato (2, 3); en este caso se empleó pulpa de café fresca la cual será empleada posteriormente como sustrato para fermentación.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si había diferencia significativa entre el método de crecimiento radial y longitudinal.

**Metodología.** Se evaluaron diez cepas de hongos filamentosos las cuales pertenecían a los géneros *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Penicillium*, y fueron proporcionadas por la CECT y la colección perteneciente al IRD-UAM. Los medios empleados fueron los siguientes: MPCA: medio infusión de pulpa de café y agar (1); PDA: agar papa dextrosa. El crecimiento radial fue evaluado en cajas de Petri (2), y para el crecimiento longitudinal se emplearon tubos de Ralph (3), en ambos casos se empleó MPCA y como testigo PDA. La velocidad de crecimiento se expresó en mm/h. Cada uno de los ensayos se realizó por triplicado.

**Resultados y Discusiones.** Se realizó un análisis estadístico para una distribución t-student, con un nivel de significancia de 0.05, en el cual se comparó la velocidad de crecimiento radial ( $V_{CR}$ ) y longitudinal ( $V_{CL}$ ) de cada una de las cepas. En la Figura 1, se muestran los datos obtenidos de la  $V_{CR}$  y la  $V_{CL}$ , en donde se observa que no hay diferencia significativa al evaluar  $V_{CR}$  y  $V_{CL}$ , empleando MPCA. Se repitió el ensayo anterior pero empleando en este caso PDA y se observó que tampoco había diferencia significativa entre la  $V_{CR}$  y la  $V_{CL}$ . Ambos parámetros nos dan la misma información sobre la velocidad de colonización del hongo sobre un sustrato. En la mayoría de los procesos donde se quiera utilizar algún microorganismo es importante garantizar que habrá un crecimiento rápido para evitar la contaminación por algún otro microorganismo indeseable y para disminuir los tiempos en el proceso.

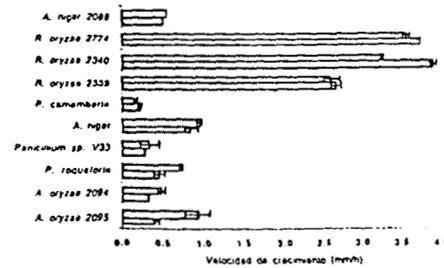


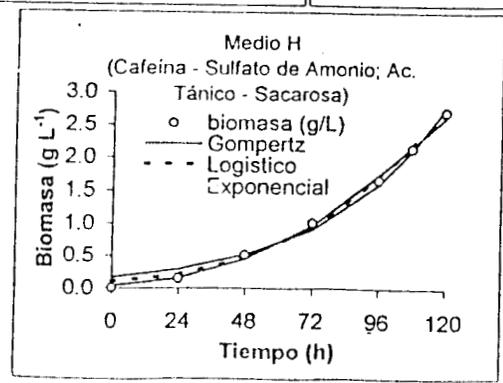
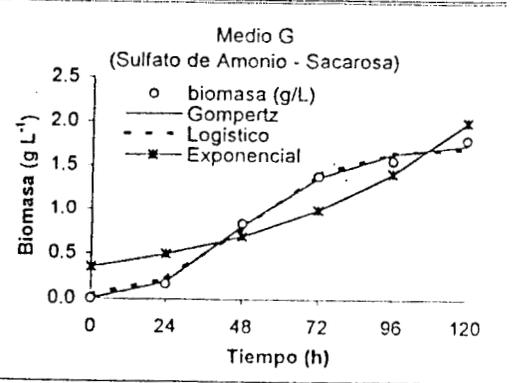
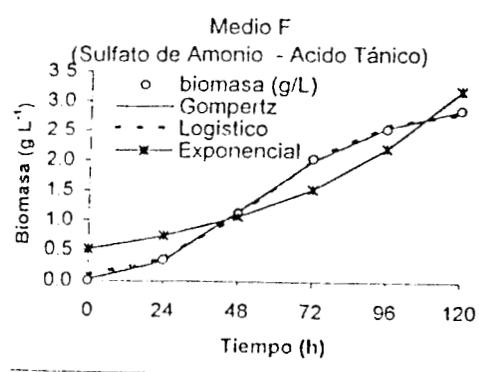
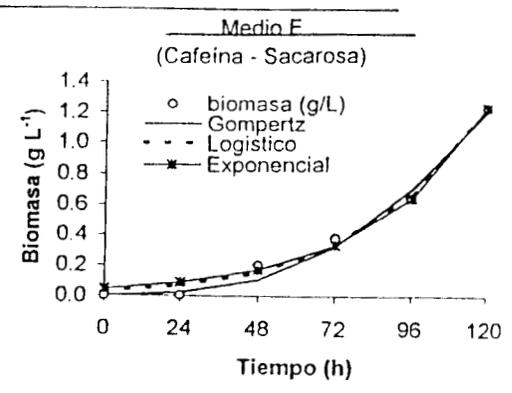
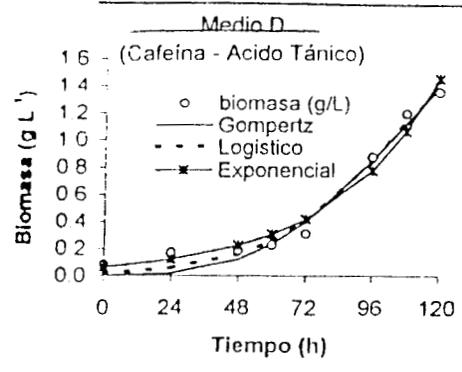
Figura 1. Velocidad de crecimiento radial (□) y longitudinal de las diez cepas evaluadas empleando MPCA. Crecimiento longitudinal (□) y crecimiento radial (■).

**Conclusiones.** En los datos obtenidos de crecimiento radial y longitudinal no hubo diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) por tanto se sugiere emplear el método de crecimiento radial como un parámetro para la selección de cepas que se quieran utilizar posteriormente para fermentaciones en medio sólido, debido a que el crecimiento superficial en medios sólidos (agar en caja de Petri) es un método además de básico, sencillo y que requiere menos tiempo que si se pretende evaluar el crecimiento longitudinal. También se puede calcular la densidad del crecimiento de la biomasa.

**Agradecimientos.** Apoyo financiero: a IC 13°C T970185.

#### Bibliografía.

1. Roussos, S., Aquihuatl, M. A., Trejo-Hernández, M. R., Perraud-Gaimé, I., Favela, E., Ramakrishna, M., 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.
2. Trinci, A.P.J. (1969). A kinetic study of growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *J. gen. Microbiol.* 57, 13-24
3. Flores, R. E., García-Burgos, M.V., Aquihuatl, A., y Saucedo-Castañeda G. (1995). Aislamiento de cepas de hongos filamentosos a partir de la pulpa. *Procedimientos naturales Vol. 2, P. 230-235. Biotecnología 2005*



Coeficiente de correlación

MEDIO	Gompertz	Logístico	Exponencial
D	0.990	0.992	0.934
E	0.993	0.995	0.935
F	1.000	0.999	0.939
G	0.998	0.995	0.930
H	0.999	0.998	0.916