



LIBERACIÓN DE ÁCIDO CAFÉICO DE LA PULPA DE CAFÉ EMPLEANDO UN EXTRACTO CON ACTIVIDAD CLOROGENATO ESTERASA DE *Aspergillus ochraceus* PRODUCIDO POR FERMENTACIÓN SÓLIDA

LIBERATION OF CAFFEIC ACID FROM COFFEE PULP USING AN EXTRACT WITH CHLOROGENATE ESTERASE ACTIVITY OF *Aspergillus ochraceus* PRODUCED BY SOLID STATE FERMENTATION

L. Ramírez-Velasco, M.A. Armendáriz-Ruiz, J. Arrizon, J.A. Rodríguez-González, J.C. Mateos-Díaz^{1*}
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A. C. Camino Arenero 1227, El Bajío del Arenal, Zapopan, Jalisco 45019, México.

Recibido 14 de octubre de 2015; Aceptado 6 de abril de 2016

Resumen

La elevada generación de residuos que contienen compuestos anti-fisiológicos durante el beneficio del café, requiere opciones para su adecuado tratamiento. Una alternativa biotecnológica interesante es aprovechar los ácidos fenólicos contenidos en la cascarilla y pulpa de café. En ambos residuos los ácidos fenólicos se encuentran esterificados, mayoritariamente en forma de ácidos clorogénicos, de los cuales puede liberarse ácido cafeico por hidrólisis enzimática. En este trabajo se produjo por fermentación en medio sólido, cultivando *Aspergillus ochraceus* sobre residuos de café, un extracto con actividad clorogenato esterasa. La mayor actividad (500 mU g⁻¹ de materia seca) se obtuvo después de 96 h de cultivo, empleando un medio sólido formulado con cascarilla de café y glucosa. La actividad clorogenato esterasa alcanzó su máximo a 50° C y pH 7, mostrando una vida media a 40° C superior a 8 h. El extracto enzimático concentrado liberó más del 90 % del ácido cafeico esterificado, contenido en la pulpa de café, en menos de 20 min a 40° C y pH 7. La estrategia utilizada en este trabajo, permite valorizar tanto la cascarilla como la pulpa del café, al aprovecharlos para la obtención de enzimas y antioxidantes como el ácido cafeico respectivamente.

Palabras clave: *Aspergillus ochraceus*, clorogenato esterasa, ácido cafeico, ácido clorogénico, cascarilla y pulpa de café.

Abstract

The generation of high amounts of wastes containing anti-physiological compounds during coffee production, requires options for its appropriate treatment. An interesting biotechnological alternative is to take advantage of the phenolic acids contained in coffee pulp and husk. In both wastes, phenolic acids are esterified mostly in the form of chlorogenic acids, of which caffeic acid can be released by enzymatic hydrolysis. In this work, an extract with chlorogenate esterase activity was produced by solid state fermentation after growing *Aspergillus ochraceus* on coffee wastes. Highest activity (500 g⁻¹ mU of dry matter) was found after 96 h of culture, using a solid medium formulated with glucose and coffee husks. Chlorogenate esterase activity reached its maximum at 50° C and pH 7, showing a half-life of more than 8 hrs at 40°C. The concentrated enzyme extract released more than 90% of the esterified caffeic acid contained in coffee pulp, in less than 20 min at 40° C and pH 7. The strategy employed in this work allows adding value to coffee wastes, because it is possible to obtain enzymes and antioxidants such as caffeic acid, using coffee husk and pulp respectively.

Keywords: *Aspergillus ochraceus*, chlorogenate esterase, caffeic acid, chlorogenic acid, coffee husk and pulp.

1 Introducción

El cultivo de café (*Coffea sp.*) es un cultivo económicamente importante a nivel mundial. Tan solo en el 2014 se produjeron 8.5 millones de toneladas del grano (ICO, 2015). Los principales subproductos del beneficio del café son la cascarilla y la pulpa; se estima que se generan más de tres millones de toneladas

anuales. La disposición de estos residuos constituye un problema ambiental por su alto contenido de compuestos anti-fisiológicos (Murthy y col., 2012). Sin embargo, en estos residuos la concentración de ácidos fenólicos contenidos como ácidos clorogénicos es interesante (de 2.3 a 26 g/kg) (Murthy y col.,

* Autor para la correspondencia. E-mail: jcmateos@ciatej.mx

2012; Rodríguez-Durán y col., 2014) y estos últimos pueden ser hidrolizados en ácido cafeico (AC) por vía enzimática (Ramírez-Martínez, 1988). Cabe destacar que en los últimos años la comunidad científica se ha interesado en obtener AC y sus derivados por vía enzimática, debido a que presentan una fuerte actividad antioxidante y muchos otros beneficios para la salud (Bailly y col., 2005; Martínez-Arámburu y col., 2015; Sato y col., 2011; Zhao y col., 2008). Por lo anterior, es de especial interés encontrar enzimas que permitan obtener o transformar al AC de manera amigable con el medio ambiente.

Las feruloil esterasas (FEs; EC 3.1.1.73) y clorogenato esterasas (CEs; EC 3.1.1.42) son carboxil éster hidrolasas capaces de liberar ácidos fenólicos. El grupo de las FEs cataliza la hidrólisis del enlace éster entre polisacáridos de la pared celular de las plantas y ácidos fenólicos (Pandey y col., 2000b). Las FEs se clasifican en cuatro tipos (A-D), en base a su secuencia primaria y a su capacidad de hidrolizar cuatro metil ésteres de ácidos hidroxicinámicos (Crepin y col., 2004). Las FEs tipo A muestran una mayor especificidad por los ésteres de ácidos hidroxicinámicos metoxilados (metil ferulato y sinapato), mientras que las tipo B por los ésteres de ácidos hidroxicinámicos hidroxilados (metil cafeato y *p*-cumarato). Las tipo C y D son inespecíficas ya que hidrolizan los cuatro sustratos de manera indistinta. Por otra parte, las CEs hidrolizan de manera más específica el enlace éster del ácido clorogénico y a diferencia de las FEs, existen muy pocos trabajos sobre su producción y caracterización (Barbe y col., 1998; Okamura y col., 1982; Schöbel y col., 1980). Cabe señalar que ambos tipos de hidrolasas pueden llegar a hidrolizar el ácido clorogénico, tal es el caso de la FE tipo A de *Anaeromyces mucronatus*, la tipo B de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, así como la tipo C de *Aspergillus oryzae* y *Talaromyces stipitatus* (Koseki y col., 2009; Levasseur y col., 2004; Qi y col., 2011; Vafiadi y col., 2006). Más recientemente (Nieter y col., 2015) reportaron que la CE de *Ustilago maydis* es hasta el momento la única enzima capaz de hidrolizar de manera preferencial el ácido clorogénico sobre el metil ferulato, sinapato, cafeato y *p*-cumarato.

Los hongos filamentosos, en particular los del género *Aspergillus*, son los principales productores de FEs y CEs. Tanto las FEs como las CEs han sido producidas por fermentación sumergida como por Fermentación en Medio Sólido (FMS), esta última ha resultado en general más adecuada ya que simula las condiciones naturales de crecimiento de esta clase de microorganismos y ofrece una

mayor productividad volumétrica, menor represión catabólica e incluso mayor estabilidad en algunas preparaciones enzimáticas (Díaz-Godínez y col., 2001; Favela-Torres y col., 1998; Jain, 1995; Minjares-Carranco y col., 1997). Además, cabe resaltar que los costos de producción de la FMS se pueden reducir si se emplean residuos agroindustriales como soporte-sustrato (Pandey y col., 2000a). La pulpa de café se ha empleado como sustrato inductor de la FE de *A. niger*, *A. tamarii*, *R. pusillus*, *Tremetes sp* (Camacho-Ruiz y col., 2016; Pérez-Morales y col., 2011) y de la CE de *A. sojae* (Adachi y col., 2008) y de *A. ochraceus* en nuestro laboratorio (Ramírez y col., 2008). Por otra parte, la obtención de AC a partir de la pulpa de café se ha logrado por biotransformación, empleando *A. niger* (Torres-Mancera y col., 2011) y por hidrólisis enzimática, empleando cocteles de pectinasas comerciales que contienen actividad FE o CE residual. Recientemente se han reportado estudios en los que se utiliza de forma individual la FE tipo B o la CE de *A. niger* recombinantes después de purificación (Asther y col., 2005; Benoit y col., 2006; Torres-Mancera y col., 2013). Hasta el momento la obtención enzimática de AC de residuos del café implica procesos multietapa, pectinasas comerciales cuya actividad reportada no es FE o CE y el uso de enzimas puras recombinantes. En este trabajo se obtuvo un extracto concentrado con actividad CE a partir del cultivo en FMS de *A. ochraceus* sobre cascarilla de café, que nos permitió liberar más del 90 % del AC contenido en la pulpa de café. El desarrollo de procesos biotecnológicos simples para la obtención de antioxidantes como el AC, sugiere que en el mediano plazo será posible aprovechar de manera más integral los residuos generados en la industria del café.

2 Metodología

2.1 Conservación de la cepa y preparación del inóculo

La cepa de *Aspergillus ochraceus* (Número de acceso NCBI: EU805804) se almacenó en tubos inclinados de agar papa dextrosa (PDA) a 4° C. El inóculo se preparó cultivando el hongo en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de PDA a 30° C por una semana. Las esporas se recolectaron con 50 mL de una solución al 0.01 % (p/v) de Tween 80.

2.2 Tratamiento de la materia prima

La pulpa y cascarilla de café fueron provistas por la empresa DIVERSIFICADOS ARGOVIA S.A. de C.V., localizada en el municipio de Tapachula, Chiapas, México. La materia prima se colectó de la despulpadora, se secó al sol durante dos días y se conservó a temperatura ambiente.

2.3 Caracterización química de la pulpa y cascarilla de café

El contenido de humedad, lípidos, proteína cruda y cenizas se determinaron de acuerdo a los métodos correspondientes de la AOAC (AOAC, 1980, 1984). El nitrógeno no proteico se extrajo de 0.5 g de muestra con NaOH 4 mM durante 2 h. La fracción proteica se precipitó con ácido tricloroacético 1.6 N y el sobrenadante se recuperó centrifugando a $3000 \times g$ (Becker y col., 1940). El contenido de carbohidratos totales se estimó por diferencia. Los minerales Ca, Na y K se determinaron por fotometría de emisión de llama (Perkin Elmer Optima 3200 RL), mientras que el Fe, Mg, Mn, Cu y Zn por absorción atómica (Perkin Elmer Analyst 200) de acuerdo a la AFNOR (AFNOR, 1984, 1996). Tras una digestión ácida, el fosfato se cuantificó espectrofotométricamente (Perkin Elmer Lambda 2) (AFNOR, 1997). Los ácidos clorogénico y cafeico se extrajeron de acuerdo al método de (Mattila y col., 2002) y se cuantificaron por HPLC.

2.4 Cultivo por Fermentación en Medio Sólido (FMS)

El medio de impregnación de la FMS contenía 4, 5, 1 y 5 g L⁻¹ de urea, K₂HPO₄, MgSO₄ y glucosa, respectivamente. El bagazo de caña, empleado como soporte, se tamizó (0.8 a 1.7 mm), lavó con abundante agua destilada y secó a 80° C por 2 días. El soporte se mezcló con los sustratos-inductores (pulpa o cascarilla de café) en una relación 50/50 (p/p). La mezcla de sólidos se impregnó con el medio 1.5 \times , con y sin glucosa, en una relación 1/2 (p/v) y se esterilizó a 121° C por 15 min. El cultivo se inoculó con 3×10^7 esporas g⁻¹ de materia seca y la humedad se ajustó a 75 %. Las columnas de vidrio (25 \times 3.0 cm) se empacaron con 40 g del medio de cultivo sólido y se incubaron en un baño de agua a 30° C. A cada columna se le suministró aire húmedo a un flujo constante de 50 mL min⁻¹. El cultivo se realizó por triplicado y se monitoreó cada 24 h durante 5 días.

2.5 Obtención del extracto enzimático producido por FMS

El extracto enzimático durante la cinética de producción se obtuvo pasando tres veces por cada columna de FMS un volumen de 70 mL del tampón de extracción (MOPS 2.5 mM a pH 7.2) a 4° C. El extracto se recuperó por gravedad y se centrifugó a $13000 \times g$ por 10 min. El extracto enzimático concentrado se obtuvo al pasar de manera seriada 70 mL del tampón de extracción a 4° C por 15 columnas con medio sólido que fue fermentado durante 96 h. El extracto concentrado se almacenó en alícuotas de 2 mL a -20° C para estudios posteriores.

2.6 Ensayos enzimáticos

La actividad clorogenato esterasa (CE) de los extractos enzimáticos producidos durante la cinética de la FMS se determinó sobre ácido clorogénico empleando *p*-nitrofenolato como indicador, de acuerdo a lo reportado por (Ramírez y col., 2008). Las mediciones y controles se realizaron por triplicado a pH 7.2 y 30° C. La disminución de la absorbancia a 415 nm se monitoreó cada 5 min en un lector de microplacas de BIORAD modelo 680 XR. Una unidad de actividad CE se definió como 1 μ mol de ácido cafeico liberado por min.

2.7 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad CE y evaluación de la estabilidad térmica

El efecto de la temperatura sobre la actividad CE se evaluó calculando la velocidad inicial de hidrólisis en un rango de 20 a 70° C a pH 7. La dependencia al pH se evaluó determinando la velocidad inicial de hidrólisis en un rango de 4 a 10 usando diferentes soluciones amortiguadoras (acetato pH 4.0-5.5; fosfato pH 6.0-7.0; TRIS-HCl pH 7.5-8.5 y glicina-NaOH pH 9.0-10.0) a 50° C. La termoestabilidad se determinó a 40 y 50° C, graficando la actividad residual del extracto enzimático concentrado incubado durante 0, 15, 30, 60 y 120 min y calculando la constante de inactivación térmica (Kd) y la vida media ($t_{1/2}$). Para estos estudios, la actividad CE se determinó empleando el método descrito por (Okamura y col., 1982).

2.8 Ensayos zimográficos

Se realizó una electroforesis en condiciones nativas empleando geles de poliacrilamida al 12 %. La migración se realizó a 100 V y 4° C. Los geles se lavaron tres veces con agua destilada y una vez con MOPS 2.5 mM a pH 7.2. La actividad FE y CE se reveló incubando cada gel en una solución con 0.01 % (p/v) de rojo de fenol y 1 % (p/v) de sustrato (FE: metil ferulato; CE: ácido clorogénico) a 30° C, hasta observar las bandas amarillas características de la actividad enzimática.

2.9 Hidrólisis enzimática de la pulpa de café

La hidrólisis enzimática de la pulpa de café se realizó adicionando 500 μ L del extracto enzimático concentrado a una solución al 10 % (p/v) de pulpa de café finamente molida en tampón fosfatos 50 mM a pH 7. La mezcla se incubó a 40° C y 170 rpm. La reacción se monitoreó a los 0, 15, 25, 60 y 120 min. El ensayo se realizó por triplicado y se analizó un blanco sin enzima para cada tiempo. La concentración de ácido clorogénico y cafeico se determinó por HPLC.

2.10 Análisis cromatográfico

La concentración de ácido clorogénico y ácido cafeico se determinó por HPLC usando un cromatógrafo Varian modelo Prostar 230 con detector UV. Una columna ZORBAX SB-C18 (250 \times 4.6 mm, 5 micron) marca Agilent se empleó como fase estacionaria a 25° C. Se inyectó 1 μ L de la muestra filtrada por 0.45 μ m y se acarreoó con acetonitrilo/agua (fase móvil) a un flujo de 0.4 ml min⁻¹ durante 20 min. El programa de elución inició con una proporción 20/80 (v/v) de la fase móvil durante 9 min, seguido de un gradiente creciente de acetonitrilo hasta 75/25 (v/v) en 3 min y esta última composición se mantuvo constante hasta el final de la corrida. El monitoreo se realizó a 300 nm.

3 Resultados y discusión

3.1 Efecto de la composición del medio de cultivo sólido en la producción de la actividad clorogenato esterasa

La producción de la actividad clorogenato esterasa (CE) de *Aspergillus ochraceus* está fuertemente influenciada por la composición del medio de cultivo

sólido (Fig. 1). Con la cascarilla de café se produjo una actividad CE de 300 mU g⁻¹ de materia seca después de 120 h de fermentación (Fig. 1b), mientras que con la pulpa de café no se detectó actividad (Fig. 1a). Esta diferencia se puede deber a la distinta composición entre la cascarilla y la pulpa de café empleados en este estudio (Tabla 1). La cascarilla de café contiene 6 veces menos carbohidratos que la pulpa (42.9 % peso seco), mientras que su contenido de fibra cruda es 3 veces mayor (69.2 % peso seco). Por lo tanto, es posible que la baja concentración de una fuente de carbohidratos en la cascarilla de café propicie que el hongo produzca la batería enzimática necesaria (celulasas, xilanasas, feruloil esterasas, clorogenato esterasas, entre otras) para degradar el material lignocelulósico y obtener así energía a partir de esta fuente de carbono. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que una fuente de carbono adicional fácilmente asimilable (i.e. 0.6-1.0 % p/v de glucosa) puede incrementar la productividad de algunas enzimas inducibles en FMS (Aguilar y col., 2001).

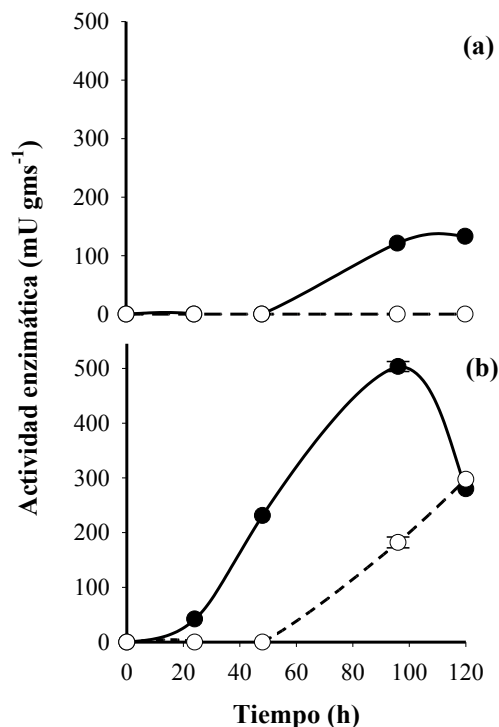


Fig. 1. Cinética de producción de la actividad clorogenato esterasa en FMS sobre diferentes residuos de café. a) Pulpa de café. b) Cascarilla de café. (o) sin y (●) con adición de glucosa 0.5% p/v. Los datos corresponden a la media (n=3).

Tabla 1. Composición en nutrientes y ácidos fenólicos de la cascarilla y pulpa de café.

Composición (% p/p)	Residuos de café	
	Cascarilla	Pulpa
Proteína	4.5	15.3
Carbohidratos	6.8	42.9
Lípidos	0.6	1.2
Humedad	6.5	6.9
Cenizas	12.4	9.6
Fibra cruda	69.2	23.9
*Ácido clorogénico	56.4	806.7
*Ácido cafeico	128.0	112.0
*Fosfato	175.0	1840.0
*Na	37.7	155.0
*Ca	1440.0	6540.0
*Zn	6.5	39.7
*Mn	11.5	1750.0
*Mg	257.0	89.9
*Cu	4.6	101.0
*Fe	132.0	3970.0
*K	1480.0	201.0

*mg Kg⁻¹ base seca. Los datos reportados corresponden al promedio (n=3) con una desviación estándar < 5%.

Así en este trabajo se decidió evaluar el efecto de la adición de 0.5 % de glucosa al medio de FMS formulado tanto con pulpa como cascarilla de café, sobre la producción de la actividad CE (Fig. 1). Bajo estas condiciones se logró producir 150 mU g⁻¹ de materia seca de actividad CE después de 120 h de fermentación sobre pulpa de café (Fig. 1a). De la misma manera, la adición de glucosa al medio sólido formulado con cascarilla de café, permitió producir la mayor actividad (500 mU g⁻¹ de materia seca) en tan sólo 96 h (Fig. 1b). Con el fin de hacer una mejor comparación de los resultados obtenidos en este trabajo con los reportados en la literatura por fermentación sumergida, se decidió reportar la productividad de la FMS en mU mL⁻¹ de medio de impregnación día⁻¹. La mayor productividad de la actividad CE de *A. ochraceus* fue 41.7 mU mL⁻¹ día⁻¹ (cascarilla de café con glucosa), siendo 4 y 18 veces mayor a la calculada con los datos que se reportan durante la producción de la CE de *A. sojae* y *A. niger* (11.9 y 2.3 mU mL⁻¹ día⁻¹ respectivamente) (Adachi y col., 2008; Asther y col., 2005). El análisis anterior evidencia que la producción de la actividad CE por FMS empleando residuos de café adicionados con glucosa, es más eficiente que lo observado hasta el momento por fermentación sumergida con diferentes inductores. Algunos autores sugieren que esta alta productividad se debe al bajo nivel de proteólisis en el cultivo sólido con respecto al sumergido, dada la

heterogeneidad y baja actividad acuosa intrínseca de la FMS (Aguilar y col., 2001; Mateos Diaz y col., 2006). Cabe resaltar que no se detectó actividad CE al emplear solamente el medio de impregnación adicionado al bagazo de caña en presencia de glucosa (datos no mostrados), lo que sugiere que es importante tanto la adición de una fuente de carbono fácilmente asimilable, como la presencia del inductor adecuado (pulpa o cascarilla de café) para producir la actividad CE de *A. ochraceus*.

Por otra parte, con el objeto de determinar el número de esterasas inducidas con el medio que presentó la mayor actividad (cascarilla de café y glucosa), se migraron las muestras obtenidas durante la cinética en un zimograma (Fig. 2). El análisis del zimograma reveló que la actividad CE corresponde solamente a una proteína que migra en la parte superior del gel (Rf = 0.77) y que puede ser detectada con esta técnica hasta el tercer día de fermentación (Fig. 2a). Por otra parte, cuando se utilizó metil ferulato como sustrato (Fig. 2b), se detectaron dos bandas; una banda mayoritaria con un Rf = 0.77 que muy probablemente corresponde a la misma proteína responsable de la actividad CE y una banda minoritaria (Rf = 0.39), que posiblemente corresponde a una feruloil esterasa carente de actividad sobre ácido clorogénico. Por lo tanto, el uso de la cascarilla de café como sustrato-inductor en presencia de 0.5 % de glucosa, permite inducir preferencialmente una

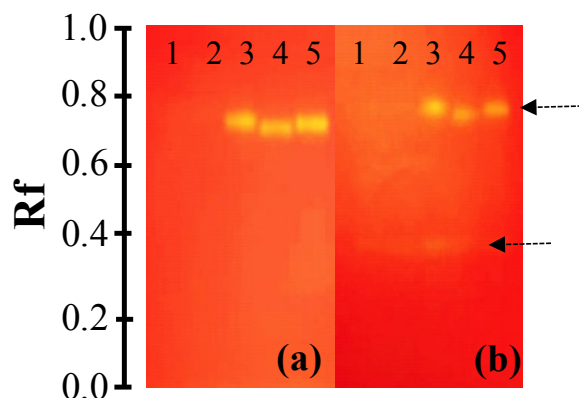


Fig. 2. Zimogramas de la cinética de FMS producida con cascarilla de café y glucosa. a) Gel revelado con ácido clorogénico. b) Gel revelado con metil ferulato. En la parte superior se indican los días de fermentación (1-5).

proteína de *Aspergillus ochraceus* con actividad CE, la cual no es específica por el ácido clorogénico, al igual que la CE de *Ustilago maydis* recientemente reportada por (Nieter y col., 2015).

3.2 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad CE y estabilidad térmica del extracto enzimático concentrado

Con el fin de conocer las condiciones a utilizar durante la hidrólisis de los ácidos clorogénicos contenidos en la pulpa de café, se evaluó el efecto de la temperatura y pH, así como la termoestabilidad (Fig. 3) de un extracto enzimático concentrado (EEC) de *A. ochraceus*. Después de realizar la extracción de 15 columnas de FMS con un mismo volumen de buffer (ver metodología sección 2.5), se logró obtener un EEC con 214 mU mL^{-1} de actividad CE determinadas a 30° C y $\text{pH } 7.2$. A continuación el EEC se utilizó para estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad CE a $\text{pH } 7$. Se observó que la actividad CE se incrementa linealmente desde los 20° C hasta alcanzar un máximo a una temperatura de 50° C , posteriormente la actividad cae drásticamente hasta llegar a 20% a 60° C (Fig. 3a). La temperatura en la cual se encontró la máxima actividad CE en el EEC de *A. ochraceus* (50° C) es similar a lo reportado para las CE de *A. niger* y *A. japonicus* (55° C) y significativamente superior a la CE de *U. maydis* (37° C) (Asther y col., 2005; Nieter y col., 2015; Okamura y col., 1982). Con referencia a la estabilidad térmica de la actividad CE presente en el EEC, se calculó una $t_{1/2}$ de 8.9 h y 0.3 h a 40 y 50° C , respectivamente (Fig.

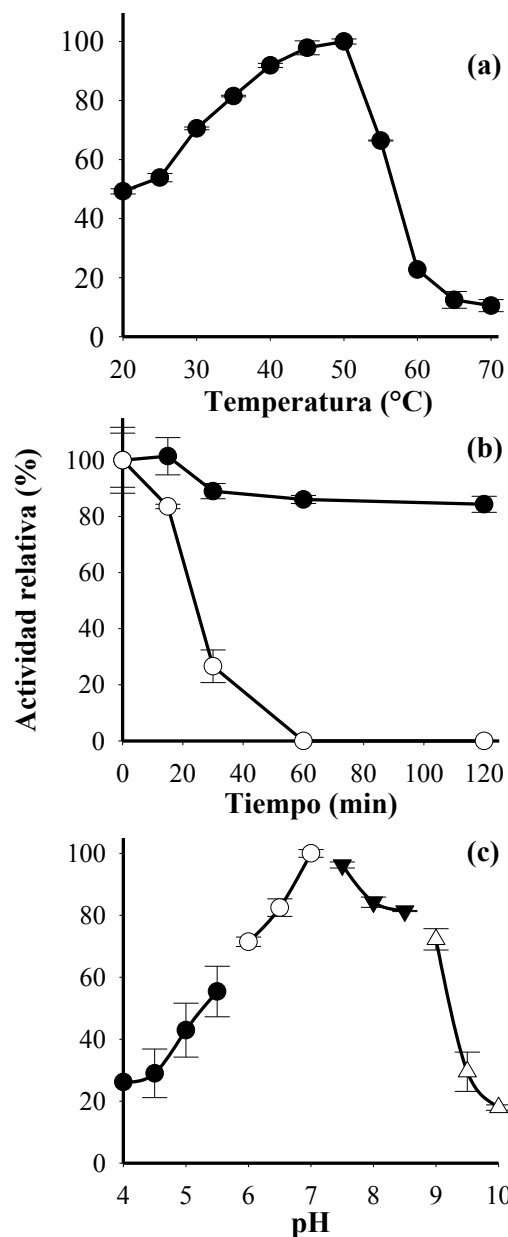


Fig. 3. Efecto de temperatura y pH sobre la actividad clorogenato esterasa del extracto enzimático. a) Efecto de la temperatura. b) Estabilidad térmica a 40° C (●) y 50° C (○). c) Evaluación del efecto del pH usando tampón (●) Acetatos; (○) Fosfatos; (▼) Tris-HCl y (Δ) Glicina-NaOH a 50 mM . Los datos corresponden a la media ($n=3$).

3b). Con base en este resultado, se decidió emplear el EEC a 40° C para llevar a cabo la hidrólisis de la pulpa de café, ya que a esta temperatura la actividad decae lentamente y llega solo a 85% de su actividad inicial después de 120 min. Resultados similares se reportan

para la CE de *A. niger* y *A. japonicus* que mantienen más de 95 % de actividad después de 20 min de incubación a 40° C (Asther y col., 2005; Okamura y col., 1982). No obstante, la actividad residual de la CE de *A. niger* es inferior al 20 % después de 10 minutos de incubación a 50° C (Asther y col., 2005), mientras que la actividad CE de *A. ochraceus* en el EEC es del 80 % a la misma temperatura de incubación (Fig. 3b). Por lo tanto, aparentemente la actividad CE de *A. ochraceus* producida por FMS es más estable a la degradación térmica que la CE de *A. niger* producida por fermentación sumergida (Asther y col., 2005). Por último, se evaluó el efecto del pH sobre la actividad CE del EEC a 50° C. De acuerdo con la Fig. 3c la actividad incrementa de pH 4 hasta pH 7, donde se alcanzó la máxima actividad CE, que baja hasta 70-80 % de la actividad inicial a pH 9.0. Este resultado es comparable con lo reportado para la CE de *A. niger*, *U. maydis* (pH 7.5) y *A. japonicus* (pH 6.5) (Asther y col., 2005; Nieter y col., 2015; Okamura y col., 1982). En todos los casos (Fig. 3.) se observa solamente un máximo de actividad, lo que sugiere fuertemente que bajo las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo, efectivamente se produce una sola proteína responsable de la actividad CE.

3.3 Liberación enzimática de ácido cafeico de la pulpa del café

El análisis de composición de los residuos de café empleados en este estudio demostró que la pulpa de café contiene 14 veces más ácido clorogénico (807 mg Kg⁻¹) que la cascarilla de café (Tabla 1). Por lo tanto, la capacidad del EEC de *A. ochraceus* para liberar el AC se evaluó solamente sobre pulpa de café a pH 7 y 40° C (dada la mayor termoestabilidad del EEC). En la Fig. 4 se muestra la liberación de AC a partir de la hidrólisis enzimática del ácido clorogénico libre contenido en la pulpa de café. Sorprendentemente, el EEC con actividad CE fue capaz de liberar más del 90 % del AC en menos de 20 min. El porcentaje de AC liberado es igual al obtenido mediante biotransformación con *A. niger* (Torres-Mancera y col., 2013), similar al alcanzado con la CE y FE tipo B de *A. niger* (100% en toda la noche) (Asther y col., 2005; Benoit y col., 2006) y superior al reportado para la CE de *U. maydis* (68 % en 20 h) (Nieter y col., 2015). Sin embargo, la liberación de AC empleando el EEC de *A. ochraceus* fue de 40 a 108 veces más rápida que en los trabajos antes mencionados, lo que sugiere que pudiera tratarse de una enzima con mayor eficiencia catalítica.

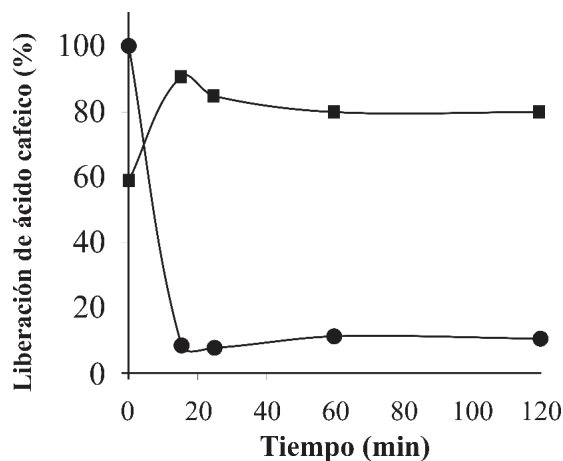


Fig. 4. Liberación enzimática de ácido cafeico por hidrólisis del ácido clorogénico contenido en la pulpa de café. Ácido clorogénico (●) y ácido cafeico (■). Los datos corresponden a la media (n=3) con una desviación estándar < 5%.

No obstante, para demostrar lo anterior, es indispensable su purificación y caracterización bioquímica. Por otra parte, debido a que *A. ochraceus* puede llegar a producir micotoxinas bajo ciertas condiciones de cultivo, es necesario obtener la secuencia de ADNc de la enzima de interés y producirla de forma activa en un huésped reconocido como seguro, lo cual permitiría su uso en la obtención de compuestos fenólicos destinados a consumo animal o humano.

Conclusiones

En este trabajo se obtuvo por primera vez un EEC con actividad CE a partir de un fermento sólido de *Aspergillus ochraceus* formulado con cascarilla de café y glucosa. En el EEC aparentemente una sola enzima es la responsable de liberar en tan solo 20 minutos más del 90 % de AC presente en la pulpa de café. La enzima responsable de la hidrólisis del ácido clorogénico producida por *A. ochraceus*, es una herramienta con interesantes aplicaciones biotecnológicas que pudieran permitir el aprovechamiento integral de los residuos agroindustriales del beneficio del café. Actualmente se está trabajando en su purificación, caracterización bioquímica y en la obtención de la secuencia del gen de interés para su expresión en un huésped adecuado que permita la producción de compuestos fenólicos destinados a consumo animal o humano.

Agradecimientos

L. Ramírez y M. Armendáriz agradecen el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el doctorado en biotecnología dentro del programa de doctorado del PICYT, incluido en el padrón de Postgrados de Excelencia.

Referencias

- Adachi, O., Ano, Y., Akakabe, Y., Shinagawa, E., Matsushita, K. (2008). Coffee pulp koji of *Aspergillus sojae* as stable immobilized catalyst of chlorogenate hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81, 143-151.
- AFNOR. (1984). *Dosage du sodium et du potassium-méthode par spectrométrie d'émission de flamme*. AFNOR, Paris.
- AFNOR. (1996). *Dosage d'éléments minéraux-méthode par spectrométrie d'absorption atomique avec atomisation électrothermique*. AFNOR, Paris.
- AFNOR. (1997). *Dosage du phosphore-dosage spectrophotométrique à l'aide du molybdate d'ammonium*. AFNOR, Paris.
- Aguilar, C. N., Augur, C., Favela-Torres, E., Viniestra-González, G. (2001). Production of tannase by *Aspergillus niger* AA-20 in submerged and solid-state fermentation: Influence of glucose and tannic acid. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* 26, 296-302.
- AOAC. (1980). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- AOAC. (1984). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Asther, M., Estrada-Alvarado, M. I., Haon, M., Navarro, D., Asther, M., Lesage-Meessen, L., Record, E. (2005). Purification and characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* catalysing the hydrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Biotechnology* 115, 47-56.
- Bailly, F., Queffelec, C., Mbemba, G., Mouscadet, J. F., Cotellet, P. (2005). Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activities of caffeic acid dimers derived from *Salvia officinalis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 5053-5056.
- Barbe, C., Dubourdieu, D. (1998). Characterisation and purification of a cinnamate esterase from *Aspergillus niger* industrial pectinase preparation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78, 471-478.
- Becker, H. C., Milner, R. T., Nagel, R. H. (1940). A method for the determination of non-protein nitrogen in soy bean meal. *Cereal Chemistry*, 477-457.
- Benoit, I., Navarro, D., Marnet, N., Rakotomanomana, N., Lesage-Meessen, L., Sigoillot, J. C., Asther, M., Asther, M. (2006). Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. *Carbohydrate Research* 341, 1820-1827.
- Camacho-Ruiz, M. A., Camacho-Ruiz, R. M., Armendáriz-Ruiz, M., Ramírez-Velasco, L., Asaff-Torres, A., Levasseur, A., Mateos-Díaz, J.C., Rodríguez-González, J.A. (2016). Corn bran as potential substrate high production of feruloyl and acetylxylan esterases by solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8, 11-21.
- Crepin, V. F., Faulds, C. B., Connerton, I. F. (2004). Functional classification of the microbial feruloyl esterases. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 647-652.
- Díaz-Godínez, G., Soriano-Santos, J., Augur, C., Viniestra-González, G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: A comparative study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 271-275.
- Favela-Torres, E., Cordova-López, J., García-Rivero, M., Gutiérrez-Rojas, M. (1998). Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry* 33, 103-107.
- ICO. (2015). Total production by all exporting countries. Disponible en: <http://www.ico.org/>. Accesado:14 de Octubre 2015.

- Jain, A. (1995). Production of xylanase by thermophilic *Melanocarpus albomyces* IIS-68. *Process Biochemistry* 30, 705-709.
- Koseki, T., Hori, A., Seki, S., Murayama, T., Shiono, Y. (2009). Characterization of two distinct feruloyl esterases, AofaeB and AofaeC, from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 689-696.
- Levasseur, A., Benoit, I., Asther, M., Asther, M., Record, E. (2004). Homologous expression of the feruloyl esterase b gene from *Aspergillus niger* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification* 37, 126-133.
- Martínez-Arámburu, D., González-Quijano, G. K., Dorantes-Alvarez, L., Aparicio-Ozores, G., López-Villegas, E. O. (2015). Changes in microstructure of *Salmonella tiphimurium* and *Listeria monocytogenes* exposed to hydroxycinnamic salts. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 14, 347-354.
- Mateos Diaz, J. C., Rodríguez, J. A., Roussos, S., Cordova, J., Abousalham, A., Carriere, F. (2006). Lipase from the thermotolerant fungus *Rhizopus homothallicus* is more thermostable when produced in solid state fermentation compared to liquid fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 39, 1042-1050.
- Mattila, P., Kumpulainen, J. (2002). Determination of free and total phenolic acids in plant-derived foods by HPLC with diode-array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 3660-3667.
- Minjares-Carranco, A., Trejo-Aguilar, B. A., Aguilar, G., Viniegra-González, G. (1997). Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 21, 25-31.
- Murthy, P. S., Madhava Naidu, M. (2012). Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-a review. *Resources, Conservation and Recycling* 66, 45-58.
- Nieter, A., Haase-Aschoff, P., Kelle, S., Linke, D., Krings, U., Popper, L., Berger, R. G. (2015). A chlorogenic acid esterase with a unique substrate specificity from *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* 81, 1679-1688.
- Okamura, S., Watanabe, M. (1982). Purification and properties of hydroxycinnamic acid ester hydrolase from *Aspergillus japonicus*. *Agricultural and Biological Chemistry* 46, 1839-1848.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. (2000a). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry* 35, 1153-1169.
- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., Brand, D., Mohan, R., Roussos, S. (2000b). Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 6, 153-162.
- Pérez-Morales, G. G., Ramírez-Coronel, A., Guzmán-López, O., Cruz-Sosa, F., Perraud-Gaime, I., Roussos, S., Saucedo-Castañeda, G. (2011). Feruloyl esterase activity from coffee pulp in solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 49, 352-358.
- Qi, M., Wang, P., Selinger, L. B., Yanke, L. J., Forster, R. J., McAllister, T. A. (2011). Isolation and characterization of a ferulic acid esterase (Fae1A) from the rumen fungus *Anaeromyces mucronatus*. *Journal of Applied Microbiology* 110, 1341-1350.
- Ramírez-Martinez, J. R. (1988). Phenolic compounds in coffee pulp: Quantitative determination by HPLC. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 43, 135-144.
- Ramírez, L., Arrizon, J., Sandoval, G., Cardador, A., Bello-Mendoza, R., Lappe, P., Mateos-Díaz, J. C. (2008). A new microplate screening method for the simultaneous activity quantification of feruloyl esterases, tannases, and chlorogenate esterases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 151, 711-723.
- Rodríguez-Durán, L. V., Ramírez-Coronel, M. A., Aranda-Delgado, E., Madhavan Nampoothiri, K., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Saucedo-Castañeda, G. (2014). Soluble and bound hydroxycinnamates in coffee pulp (*Coffea arabica*) from seven cultivars at three ripening

- stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 7869-7876.
- Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics* 403, 136-138.
- Schöbel, B., Pollmann, W. (1980). Further characterization of a chlorogenic acid hydrolase from *Aspergillus niger* (autor transl). *Zeitschrift für Naturforschung Section C: Biosciences* 35, 699-701.
- Torres-Mancera, M., Cordova-López, J., Rodríguez-Serrano, G., Roussos, S., Ramírez-Coronel, M., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G. (2011). Enzymatic extraction of hydroxycinnamic acids from coffee pulp. *Food Technology and Biotechnology* 49, 369-373.
- Torres-Mancera, M. T., Baqueiro-Peña, I., Figueroa-Montero, A., Rodríguez-Serrano, G., González-Zamora, E., Favela-Torres, E., Saucedo-Castañeda, G. (2013). Biotransformation and improved enzymatic extraction of chlorogenic acid from coffee pulp by filamentous fungi. *Biotechnology Progress* 29, 337-345.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Christakopoulos, P., Faulds, C. B. (2006). The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: Determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsfAeC. *Journal of Biotechnology* 125, 210-221.
- Zhao, Z., Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry* 109, 691-702.