

78



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

RECUPERACION Y BIOTRANSFORMACION DEL
ACIDO FERULICO

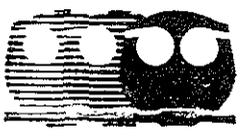
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

NASHIELLY PAOLA TERCERO MATOS



MEXICO, D. F.

2301



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal: Prof. María de Lourdes Gómez Ríos
Secretario: Prof. Francisco Ruíz Terán
1er suplente Prof. Carlos Manuel Shelly Álvares-Tostado
2do suplente Prof. Maricarmen Quirasco Baruch

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 321 del Edificio E de la Facultad de Química,
UNAM.

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Dr. Francisco Ruíz Terán Francisco Ruiz Terán

Nombre completo y firma del supervisor técnico:

Dr. Arturo Navarro Ocaña Arturo Navarro Ocaña

Nombre completo y firma del sustentate:

Nashielly Paola Tercero Matos Nashielly Paola Tercero Matos



La ciencia es un juego, pero un juego con la realidad, un juego con los cuchillos afilados. Si alguien corta con cuidado una imagen en mil trozos, puedes resolver el rompecabezas si puedes colocar las piezas en su sitio. En un juego científico, tu rival es el Buen Señor. No sólo ha dispuesto el juego, sino también las reglas aunque estas no sean del todo conocidas. Ha dejado la mitad para que tu las descubras o las determines. Un experimento es la espada templada que puedes empuñar con éxito contra los espíritus de la oscuridad, pero que también puede derrotarte vergonzosamente. La incertidumbre radica en cuantas reglas ha creado el propio Dios de forma permanente y cuantos parecen provocados por tu inercia mental; la solución sólo se vuelve posible mediante la superación de este límite. Tal vez esto sea lo más apasionante del juego. Por que, en tal caso, luchas contra la frontera imaginaria entre Dios y tú, una frontera que quizás no exista.

Erwin Schrödinger

DEDICATORIAS

A mis padres, Guillermo Tercero y María Elena Matos, por otorgarme la vida con valentía y coraje. Por ser la fuente de inspiración y por haberme brindado la oportunidad de ser mi misma y de lograr lo que hasta ahora he hecho.

A mi madre, que con sus brazos me ha abrigado, con sus pies ha caminado a mi lado, que con sus palabras y sus actos me ha enseñado lo que es el amor, el ser libre y el lograr lo inalcanzable.

A mi padre, porque lo amo. Por tener la esencia de lo extraordinario, por ser un gran apoyo y porque siempre está aquí junto a mí.

A mi hermano Omar, por enseñarme que la vida no es tan estricta y que uno no puede perder la esencia de si mismo.

A mi abuela, Eloisa, por ser cómo es, por amar intensamente según su camino y por darme la memoria de lo desconocido.

A Coco, Peter, Ruth, Dulce, Victor, Vero, Andrea, Fernanda, Pavel, Carol, Samy, Luis Gabriel, Rolando, Sarai, Rebeca, Ahab, Oscar, David, Sara y Brenda por su amor, apoyo y comprensión.

A Pina, Lucía, Alba, Irene, Luis, Betty, Julio, Angel, Carmen, Mario por darme una gran familia con la que siempre puedo contar.

A Checo, por ser mi compañero, mi amigo y un gran apoyo.

A Talla, por lo que hemos vivido juntas, por los sueños interminables, por las risas, porque siempre has sido tú.

A Yaz, por ser ella, por las carcajadas, por el trabajo y los tiempos compartidos.

A Paris, por el "hola bonita" que siempre me ha estrenecido. Por el gran amor que hay en tu corazón.

A Tomás, por enseñarme que la vida es sencilla y que da muchos vuelcos, por las risas y las bromas.

A mis compañeros maestros del Centro Educativo Albatros, en especial a Ate, Gabo y Jamín, por apoyarme y compartir momentos inolvidables.

A mis niños, por ser el motor que mueve mi interior.

A los que ya no están y sin embargo nunca hemos dejado de sentir su presencia. Gracias por la fuerza dada a través de los años.

AGRADECIMIENTOS

A Pancho, por brindarme la oportunidad de hacer, de ser y de aprender. Por recordarme qué es lo que importa en la vida y por darme una parte de él.

A Arturo por la asesoría brindada para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Rocío Santillana Minojosa por su gran apoyo técnico en el manejo del cromatógrafo de líquidos.

*A la compañía que tuve en el laboratorio 321 y 314 del Edificio E:
Checo, Luis, Daniel, Carmen, Adriana, Alfonso, Sergio, Erick, Carlos Almanza (HPLC) y Agustín.*

ADGAPA por el apoyo brindado durante la realización del proyecto PAPIT IN209300.

A la Facultad de Química.

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Orígenes de la vainilla	2
Información de la vainilla	3
Características de la vainillina	3
Usos en la industria alimenticia y farmacéutica	5
Comercialización de la vainillina	6
Fuentes de obtención de la vainillina	7
A partir de la planta <i>Vainilla planifolia</i>	7
A partir del eugenol	9
Biotransformación de diferentes sustratos	10
Información del ácido ferúlico	13
Características químicas y biológicas del ácido ferúlico	13
Importancia y utilización del ácido ferúlico en la industria alimenticia y farmacéutica	15
Fuentes del ácido ferúlico	16
Extracción del ácido ferúlico a partir de gramíneas	19
Extracciones a través de una hidrólisis alcalina	19
Extracciones a través de una hidrólisis ácida	19
Biotransformación del ácido ferúlico a vainillina	20
Importancia y ventajas de la biotransformación para la obtención de vainillina natural	23
OBJETIVOS	24
HIPÓTESIS	25

MATERIAL Y MÉTODOS	26
Recuperación del ácido ferúlico a partir del nejayote utilizando Acetato de etilo	26
Obtención del ácido ferúlico a partir del bagazo de caña y pulpa de café	27
Hidrólisis alcalina con NaOH 1M del bagazo de caña y la pulpa de café a 25 °C	
Hidrólisis alcalina con NaOH 4M del bagazo de caña y la pulpa de café a 105 °C durante 15 minutos	
Detección del ácido ferúlico por cromatografía en capa fina	28
Purificación del ácido ferúlico a través de una columna Cromatográfica	30
Recristalización del ácido ferúlico	30
Evaluación de los diferentes métodos de recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote	31
Recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote con una columna de carbón activado	
Recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote utilizando una mezcla con carbón activado	
Aislamiento del microorganismo a partir de nejayote, bagazo de caña y pulpa de café	34

Purificación de las cepas aisladas a partir de nejayote, del bagazo de caña y pulpa de café	34
Biotransformación del ácido ferúlico utilizando el microorganismo seleccionado	35
Monitoreo del microorganismo durante la fermentación	36
Identificación y cuantificación de la vainillina como producto de la biotransformación del ácido ferúlico utili- zando HPLC (cromatografía de líquidos de alta resolución)	38
Curvas de calibración	
Cuantificación del ácido ferúlico en nejayote, bagazo de caña y pulpa de café	39
Preparación de la muestra	
Inyección de la muestra	
Cálculo de la concentración	40
Cuantificación de la vainillina como producto de la bio- transformación a partir del ácido ferúlico	
Preparación de la muestra	
Inyección de la muestra	
Cálculo de la concentración	

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Obtención del ácido ferúlico a partir de bagazo de caña y pulpa de café	
Evaluación de los diferentes métodos de recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote	
Aislamiento de las cepas a partir de nejayote, bagazo de caña y pulpa de café	
Biotransformaciones utilizando el microorganismo seleccionado	
Identificación y cuantificación de la vainilina como producto de la biotransformación a partir de ácido ferúlico utilizando HPLC (cromatografía de gases de alta resolución)	
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOGRAFÍA	57
APÉNDICE	67

Introducción

Un procedimiento que ofrece diversas ventajas para la obtención de sabores naturales es el uso de la biotecnología, en el cual participan microorganismos, cultivos vegetales y enzimas.

Desde que la legislación de la Comunidad Económica Europea incorporó bajo el término de productos naturales a los derivados de fuentes biológicas, como células o sus componentes incluyendo las enzimas, el uso de la biotecnología se ha convertido en una alternativa para satisfacer la demanda de productos naturales. Entre las ventajas que ofrece la biotecnología como un proceso alternativo a los procedimientos que se han seguido hasta ahora para obtener los productos naturales –principalmente de plantas– está la independencia de la agricultura, así como de pérdidas debidas a las condiciones locales de producción (clima, pesticidas, fertilizantes, restricciones legales e inestabilidades políticas).

Entre los principales saborizantes y aromatizantes utilizados en la industria alimenticia y farmacéutica está la vainillina, de la cual sólo el 0.2% del la que se encuentra en el mercado es extraída de fuentes botánicas (Berger, 1998).

Uno de los principales sustratos utilizados para la obtención de vainillina es el ácido ferúlico, el cual se encuentra principalmente en las paredes celulares de las plantas y puede ser extraído a través de una hidrólisis (Classen, 1990).

Entre las fuentes estudiadas y que se reportan como una fuente para la extracción del ácido ferúlico son el maíz y la melaza de caña (Guillon, 1989). Sin embargo existen algunos otros desechos agroindustriales de donde se puede extraer este compuesto como lo son el bagazo de caña, la pulpa de café, las cascarillas de trigo y de arroz, y para el caso especial de México el nejayote.

Orígenes de la vainilla

Conocida en todo el mundo y valorada por los mejores catadores, la vainilla se relaciona originalmente con la cultura totonaca, de la región de Papantla, Veracruz. Se dice que el perfumado fruto, llamado en nahuatl "tlixóchitl", que significa vaina negra, era uno de los tributos que exigían los aztecas a pueblos conquistados en los territorios del Este, quienes la utilizaban para proporcionarle sabor a sus bebidas.

Debido a la conquista española, en 1510 la vainilla fue introducida a Europa —comenzando a peregrinar a España (donde la utilizaban en la confección de perfumes, y también para aromatizar el chocolate como hacían los indígenas mexicanos) seguida de Inglaterra en 1800, para continuar más tarde hacia la región francesa, llegando hasta las islas del Océano Índico, arribando a mediados del siglo XIX a Madagascar, la cual ha llegado a convertirse después de mucho tiempo, en el mayor productor mundial de la vainilla; pero no fue sino hasta 350 años después que se cultivó en el extranjero, siendo México el único abastecedor de vainilla en este continente.

Charles Morren desarrolló un método artificial de polinización de las flores de vainilla en 1841 fue el primero que pudo producir vainas de vainilla fuera de México. (Rao S.R., 2000)

La vainilla, es una orquídea tropical perteneciente a la familia de Orquidáceas y alrededor de 110 especies han sido identificadas, pero sólo 3 especies tienen importancia comercial: *Vanilla fragrans* también conocida como *Vanilla planifolia*, *Vanilla pompona* y *Vanilla tahitensis*. La especie más cotizada es *Vanilla planifolia* debido a sus características (Rao R.S., Ravishankar G A 2000). La *Vanilla planifolia* es la especie responsable del 99% de la vainilla importada en Estados Unidos (Wilez and Jons, 1992).

Características de la vainillina

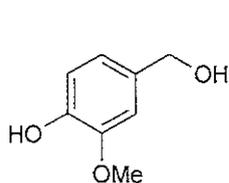
La vainilla natural es una mezcla compleja de componentes aromatizantes y saborizantes provenientes de la vaina de la vainilla. Más de 170 componentes aromáticos volátiles han sido identificados.

En la tabla 1 se muestran los componentes mayoritarios de la vaina curada de vainilla, en donde se observa que la vainillina ocupa el porcentaje más alto.

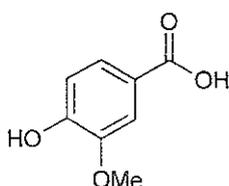
Los componentes que en mayor medida confieren el sabor a vainilla son: el ácido vainílico, el alcohol vainílico, el p-hidroxibenzaldehído, el ácido p-hidroxibenzoico y el p-hidroxibenzilalcohol. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 1.

Componente	g/kg (base seca)
Vainillina	20
Ácido vainílico	1
p-hidroxibenzaldehído	2
p-hidroxibenzil-metil-eter	0.2
Azúcares Totales	250
Grasa	150
Celulosa	150-300
Minerales	60
Agua	350

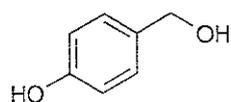
Tabla 1. Componentes mayoritarios presentes en la vaina de vainilla curada



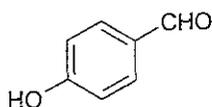
Alcohol vainillico



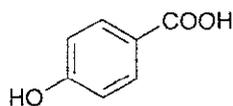
Acido vainillico



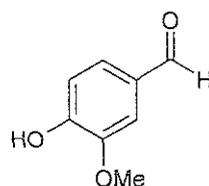
Alcohol p-hidroxibencilico



p-hidroxibenzaldehido



Acido p-hidroxibenzoico



Vainillina

Figura 1. Estructuras químicas de los componentes mayoritarios que confieren el sabor a vainilla.

La vainillina, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehido es uno de los saborizantes más comunes utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica. Es el componente mayoritario de las vainas de vainilla.

Usos en la industria farmacéutica y alimenticia de la vainillina

La vainillina por ser una sustancia estimulante del gusto y del olfato, es utilizada como un aditivo en alimento para animales, en la industria del chocolate, en vinos y licores, helados, confitería, en cigarros y puros, en productos horneados tales como pasteles, galletas, etc.

Es también utilizado en caramelos y en café. Es usado como especia en formulaciones de oleorresinas y salsas.

Además de ser un antídoto para neutralizar los efectos de *Chinorex fleckeri* (medusa), es también utilizado, como componente antifúngico e inhibidor del crecimiento de levaduras en purés de frutas.

En la industria farmacéutica se utiliza principalmente como un ingrediente en perfumes y cosméticos (Rao, S.R. 2000).

Comercialización de la vainillina y la posición que ocupa en el mercado global de los saborizantes y aromatizantes

Aproximadamente 12,000 toneladas de vainillina son consumidas anualmente, donde sólo 20 toneladas provienen de las vainas de vainilla; el resto es producido sintéticamente. Aproximadamente, a partir de 500 kg de vainilla se obtiene alrededor de 1kg de vainillina, teniéndose que polinizar alrededor de 40,000 flores (Rao R.S., Ravishankar G.A. 2000).

En el mercado mundial el sabor natural de vainilla alcanza los 80 millones de dólares. La vainillina de origen natural es cotizada en 4,000 dólares el kilogramo, mientras que la vainillina sintética alcanza 12 dólares por kilogramo.

Según la definición del Código Estadounidense de Regularizaciones Federales un saborizante natural se define como “ un aceite esencial, oleoresina, esencia o extracto, hidrolizado proteico, destilado de cualquier producto obtenido a través de un calentado, asado o un proceso enzimático, que contenga los constituyentes saborizantes derivados de un condimento, jugo de fruta, verdura o su jugo, levadura comestible, hierbas, raíz, corteza, hoja o material similar, carne, pescado, huevos, aves, productos derivados de la leche o fermentados cuya función en alimentos es proporcionarle sabor más que darle un aporte nutrimental. Un sabor artificial es definido como cualquier sustancia, cuya función es impartir sabor, y su origen no es ninguno de los antes mencionados. (Whitehead, I.M., 1998)

Fuentes de obtención de la vainillina

A partir de *Vainilla planifolia*

El proceso general para la obtención de la vainilla es el siguiente:

- a) Polinización manual de las plantas de vainilla.
- b) Recolectado de la cosecha.
- c) "Matado".
- d) Sudado
- e) Secado.
- f) Beneficio.

El proceso convencional de cultivo de la vainilla requiere de que la polinización de las flores se realice de manera manual. Este paso es difícil de realizar, ya que se requiere de mano de obra especializada y casi nunca se cuenta con la necesaria.

En el "Matado" se detiene el metabolismo aerobio de la vaina y la vida vegetativa. En el "Sudado" se deshidrata la vaina rápidamente y se lleva a cabo una fermentación lenta, en donde ocurren reacciones enzimáticas y no enzimáticas formándose así, azúcares, fenoles, quininas, pigmentos, vainillina y otros compuestos aromáticos. En el Secado las vainas quedan con un 20-25% de humedad. Durante el proceso de curado, la glucovainillina es enzimáticamente convertido por la glucosidasa en glucosa y en un aldehído de vainilla.

Durante el acondicionamiento de las vainas, éstas son colocadas en cajas cerradas durante algunos meses, donde definen sus características de fragancia (Wilez and Jons, 1992).

Existen diversos factores que condicionan la concentración de los componentes de la vainilla tales como las condiciones de crecimiento, la nutrición, etc. Las vainas curadas de vainilla contienen azúcares, fibras de lignocelulosa,

ácidos orgánicos, vainillina, fenoles, aceites, resinas, gomas, pigmentos, minerales, compuestos aromáticos y aceites esenciales.

Los constituyentes que son los responsables del aroma y del sabor de la vainilla son los carbonilos, los alcoholes aromáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, fenoles, alcoholes alifáticos, lactones aromáticos, hidrocarburos alifáticos, terpenoides, heterociclos, etc. Los componentes no volátiles que le proporcionan el sabor a la vainilla son: taninos, polifenoles, resinas y aminoácidos libres (Rao R.S., Ravishankar G.A. 2000).

En la Tabla 2, se muestra la producción de vainilla en los diferentes países, donde se observa que México ocupa el tercer lugar junto con China, siendo Indonesia el principal productor de esta vaina

<i>Vainilla</i> <i>Producción (Millones de toneladas)</i>	Año
	2000
China	550
Mundo	5,485
Comoras	180
Guadalupe	40
Indonesia	2,102
Kenya	8
Madagascar	1,815
Malawi	20
México	550
Polinesia Francesa	40
Reunión	30
Tonga	50
Turquía	50
Uganda	40
Zimbabwe	10

Tabla 2. Producción de vainilla. Fuente: FAO

A partir de eugenol

Por mucho tiempo, la fuente más importante de vainillina fué el eugenol (componente mayoritario del clavo), cuyo precio está en US\$5/kg.

Tiemann en 1876 desarrolló tres métodos químicos para producir vainillina a partir del eugenol:

- a) El eugenol es isomerizado a isoeugenol con hidróxido de potasio en dietilenglicol. Éste es aislado y transformado en su acetato para ser oxidado. La vainillina se aísla después de acidificar el extracto.
- b) El isoeugenol es oxidado directamente a vainillina con pentóxido de vanadio/ H_2O_2 , reactivo en ter-butil-alcohol.
- c) El eugenol es oxidado con nitrobenzeno en una solución básica de dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener vainillina.

El eugenol ha sido utilizado también como sustrato en diversas biotransformaciones; sin embargo es muy tóxico para los microorganismos, causa lisis en la célula, inhibe el crecimiento y el metabolismo de éstos.

Biotransformación de diferentes sustratos

La vainillina puede ser obtenida a través de diferentes microorganismo y a partir de diferentes sustratos. En la Tabla 3 se muestra un listado de microorganismos capaces de producir vainilla.

Microorganismo	Sustrato	Producto	Referencia
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Falconer et al 1994
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Lesage-Meessen et al 1996
<i>Pseudomona acidovorans</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Toms y Wood 1970
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Labuda et al 1993
<i>Spirulina platensis</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Ramachandra Rao et al 1996
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	UshaTripathi et al 1999
<i>Paecilomyces variotti</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Rahouti et al 1989
<i>Escherichia coli</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Otuk 1985
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Krishnamohan y Khanna 1994
<i>Streptomyces setonni</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Sutherland et al 1983
<i>Fomes fomentarius</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Ishikawa et al 1963
<i>Polyporus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Rosazza et al 1995

Tabla 3. Microorganismos utilizados en la biortransformaciones de diferentes sustratos para la obtención de vainillina.

Información de la vainillina

Microorganismo	Sustrato	Producto	Referencia
<i>Brettanomyces anomalus</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Edlin et al 1995
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Eugenol	Vainillina	Tadasa y Kayahara 1983
<i>Pseudomonas spp</i>	Eugenol	Vainillina	Rabenhorst 1996
<i>Serratia</i>	Eugenol	Vainillina	Rabenhorst 1991
<i>Arthobacter globiformis</i>	Eugenol	Vainillina	Cooper 1987
<i>Aspergillus niger</i>	Vanilamina	Vainillina	Yoshida et al 1997
<i>Escherichia coli</i>	Vanilamina	Vainillina	Yoshida et al 1997
<i>Proteus vulgaris</i>	m-Metoxitirosina	Vainillina	Casey y Dobb 1992
<i>Stilbene dioxygenasa</i>	Isoraponina	Vainillina	Hagedorn y Kaphammer 1994
<i>Lipoxigenasa</i>	Ácido ferúlico	Vainillina	Markus et al 1992
<i>Lypoxigenasa</i>	Coniferil aldehído	Vainillina	Mane y Zucca 1992
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Alcohol vainillico	Vainillina	Fraaije et al 1997
<i>Pycnopus cinnabarinuss</i>	Ácido vainillico	Vainillina	Lesage-Meesen et al 1997

Tabla 3. (Continuación) Microorganismos utilizados en biotransformaciones de diferentes sustratos para la obtención de vainillina.

Información de la vainillina

Como se pudo observar en la Tabla 3 el principal sustrato para la obtención de vainillina a través de biotransformación es el ácido ferúlico.

La vainillina es también un metabolito intermediario en la degradación de una variedad de productos naturales, incluidos los estilbenos, el eugenol y el ácido ferúlico (Lomascolo A, 1999).

Características químico-biológicas del ácido ferúlico

El ácido ferúlico (4-hidroxi-3-metoxi-trans-acido cinámico) fue descrito en 1866 como un componente de *Ferula foetida*, (Rosazza JPN, 1995); es el más abundante ácido hidroxicinámico presente en las paredes celulares de las plantas (Iiyama K., 1990). En la Figura 2 se observa el arreglo molecular que tiene el ácido ferúlico en las paredes celulares del maíz, el cual se encuentra covalentemente ligado a polisacáridos por enlaces éster y a compuestos de la lignina por enlaces éter. Este mismo modelo es aplicable a todas las plantas en especial a las gramíneas.

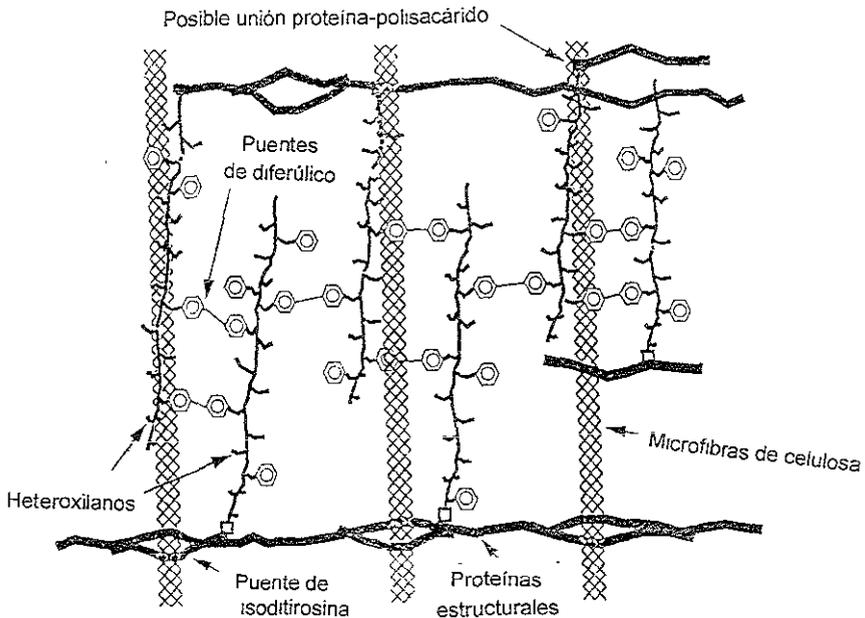


Figura 2. Modelo molecular de las paredes celulares del maíz. (Saulnier y Thibault, 1999)

Información del ácido ferúlico

Dentro del conjunto de los ácidos cinámicos se encuentran el ácido ferúlico y el 4-ácido cumárico los cuales son liberados durante la extracción de la lignina. En la figura 3 se observan los enlaces eter o ester con los que está unido el ácido ferúlico a la lignina y la manera en que forma puentes diester-eter entre los polisacáridos

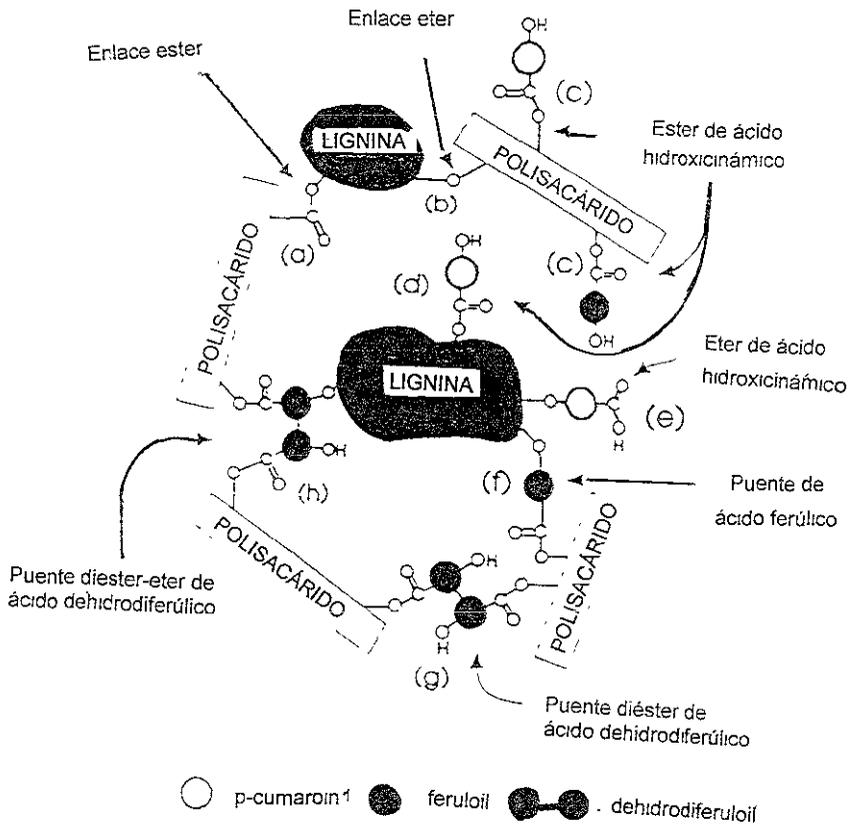


Figura 3. Esquema del arreglo molecular del ácido ferúlico y otros ácidos hidroxicinámicos en la lignina.

Importancia y utilización del ácido ferúlico en la industria alimenticia y farmacéutica

El ácido ferúlico es utilizado como antioxidante natural en alimentos, es un ingrediente activo en lociones y cremas que protegen de los rayos UV solares (Micard, V., Grabber et al 1997), siendo un fotoprotector protege al cuerpo de radicales libres y especies reactivas del oxígeno. A este compuesto también se la ha asociado con actividades antihepatóxicas, antitumorales, antiestrogénicas y antimicóticas. Además, el ácido ferúlico es utilizado en una gran cantidad de suplementos alimenticios, tales como los complejos vitamínicos y productos naturistas (Kroon P.A., Williamson G. 1999).

Hay un sustancial interés en el potencial del ácido ferúlico por la producción biotecnológica de la vainillina, uno de los principales saborizantes y componentes que proporcionan aroma en todo el mundo (Herman K, 1989).

En plantas, el ácido ferúlico es precursor de una gran variedad de compuestos antimicrobianos, moléculas receptoras de señales y fitoalexinas las cuales tienen un papel importante en las respuestas de defensa de la planta (Gasson, M.J., 1988).

El ácido ferúlico junto con el ácido p-cumárico retardan la captura de iones y la síntesis de proteínas en plantas, inhiben la germinación de la semilla y los productos de degradación de éstos retardan el crecimiento de patógenos en plantas. Se demostró que los ácidos fenólicos retardan el crecimiento de una variedad de organismos comprendidos en el ciclo del nitrógeno (Turner, 1975).

Si ácido ferúlico es adicionado al suelo, existe un incremento en el desprendimiento de CO₂ (Turner, 1975).

En algunos estudios que se han realizado sobre el maíz, la resistencia de algunas poblaciones ante plagas está en relación a la concentración de los ácidos fenólicos en el pericarpio, encontrándose dichos ácidos en mayor cantidad en los maíces que no son tan susceptibles a las plagas. Se ha sugerido por tanto que la cantidad de ácido ferúlico está relacionado con la susceptibilidad o a la resistencia que tiene el maíz ante plagas (Classen, D., 1990).

Classen a través de microscopía fluorescente reportó que los ácidos fenólicos se encuentran en mayor cantidad en el pericarpio (la parte externa de la cubierta del grano) que en el endospermo. Este último estudio corrobora la función de los compuestos fenólicos en la resistencia del maíz ante plagas

Fuentes del ácido ferúlico

Gramíneas como fuente de ácido ferúlico

Gramineae (Poaceae, gramíneas), constituye una familia cosmopolita con unos 500 géneros y tal vez unas 8,000 especies. Pertenecen al orden Juncales en la clase *Commelinidae*. Probablemente es la familia individual más importante de plantas desde el punto de vista de consumo humano. El trigo, el arroz, el maíz, la avena, el centeno, la cebada, la caña de azúcar y el bambú son ejemplos de gramíneas importantes para el hombre (Cronquist, A 1987)

El ácido ferúlico se encuentra aproximadamente en un 2% en las cascarillas del grano de maíz. En 1990 cerca de 8 mil millones de bushels (35.273 L) de maíz fueron cosechados en Estados Unidos, los cuales produjeron 1 mil millones de libras de ácido ferúlico como materia prima para biotransformaciones (Huang et al 1993).

En monocotiledoneas, como el maíz, el ácido ferúlico está esterificado al carbono 5 del grupo hidroxilo de algunos residuos de piranosas, de arabinos y de arabinosas (Hartley et al 1990).

En dicotiledoneas, el ácido ferúlico está esterificado al carbono 2 del grupo hidroxilo de los residuos de galactopiranosas de la pectina (Ralet et al 1994).

México, produce una gran cantidad de maíz, según los reportes de la SAGAR en el año 2000 se produjeron 19,240 miles de toneladas en un área equivalente a 8 millones de hectáreas. Debido a que la producción nacional es insuficiente para satisfacer las demandas de maíz, también se importa una gran cantidad de éste, alrededor de 4.7 millones de toneladas en 1998.

Existen diversas maneras en que el maíz es consumido, entre las que se encuentran: harina para tortilla, que abarca el 18% de la producción nacional; Maíz destinado a la elaboración de la tortilla, alcanzando un 17%; el consumo rural equivale a un 12%; Como base de alimentos equivale al 40% y otras formas de consumo equivale al 13%.

Cabe señalar que la producción de maíz en nuestro país no es homogénea geográficamente, en el Oeste se produce el 12% de la producción nacional, seguida de la región Noreste que aporta el 14%. La región Sureste aporta el 25% y finalmente el Centro de la República aporta el 49%. En el periodo Primavera-Verano se obtiene el 86% de la producción nacional y el 14% se obtiene durante Otoño-invierno.

Información del ácido ferúlico

La caña de azúcar, como ya se mencionó es una gramínea, perteneciente al género *Saccharum Officinarum*, tiene de 2 a 5 metros de altura con tallos sólidos, alrededor de un decímetro de diámetro y se puede obtener hasta un 20% de azúcar en peso. La producción de caña de azúcar en el año 2000 fue de 29,098,114 miles de toneladas.

El café, es una angiosperma (semilla). Se prepara a partir de semillas maduras de diversas especies de *Coffea*, principalmente *C.arabica*.

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial como productor de café, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam. La variedad que produce es la *arabica* y dentro de ésta, se clasifica en el grupo de "otros suaves". El café se produce sobre una superficie de 690 mil hectáreas, en doce estados de la República. La producción total en México en el años 2000 fue de 1,985,866 miles de toneladas.

En México, el café es producido por cerca de 300 mil productores, agrupados en 16 organizaciones (SAGAR,2001).

Extracción del ácido ferúlico a partir de gramíneas

Debido a el arreglo molecular que tiene el ácido ferúlico en las moléculas de lignina, se ha determinado que a través de una hidrólisis de los enlaces ésteres se puede liberar el ácido ferúlico. Existen 3 tipos de extracciones, las cuales se describirán a continuación.

Hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina consiste en colocar el grano en un contenedor y adicionarle NaOH 2N. Dicho contenedor se mantiene en agitación y es acidificado hasta un pH=2 con HCl . La mezcla es centrifugada y el sobrenadante es sometido a extracciones con acetato de etilo. Las fases orgánicas se recolectan para posteriormente evaporar el disolvente y obtener el ácido ferúlico. Los rendimientos varían según el tiempo de hidrólisis, reportándose 199-443 $\mu\text{g/g}$ en 4 horas y 113-1194 $\mu\text{g/g}$ para 18 horas (Classen, J.T., Arnason, J.A., et al).

Hidrólisis ácida seguida de una hidrólisis enzimática

Este tipo de hidrólisis comienza con un hidrolizado con H_2SO_4 0.2N en un baño de agua. El recipiente es enfriado; se adiciona una suspensión de amilasa fúngica en acetato de sodio acuoso. La mezcla es incubada y centrifugada. Los ácidos fenólicos son extraídos con acetato de etilo. El extracto es secado con sulfato de sodio anhidro y concentrado en un rotavapor. (Pussayanawin, Wetzels, 1987) El rendimiento de esta técnica es de 37-416 $\mu\text{g/g}$.

Biotransformación del ácido ferulico a vainillina

Existen diferentes alternativas para la biotransformación del ácido ferúlico, tales como la utilización de bacterias, hongos, tejidos vegetales y levaduras. Sin embargo entre las biotransformaciones más relevantes y que producen vainillina como un bioproducto están las bacterias y algunos hongos.

Tomando un ejemplo de una biotransformación utilizando ácido ferúlico como sustrato se encuentra aquélla realizada por *Streptomyces setonii* (Figura 4), la cual acumula vainillina como el principal producto en el metabolismo del ácido ferúlico (Muheim, 1999).

Otro ejemplo de la biotransformación del ácido ferúlico (Figura 5) es la que se observa con *Pseudomona fluorescens*. La presencia de la CoASH, MgCl₂ y ATP permiten que esta bacteria pueda hacer la conversión. Se ha encontrado que esta bacteria puede convertir hasta 18% de ácido ferúlico en vainilina (Narbad 1998).

Para el caso de *Escherichia coli*, la ruta metabólica es muy similar a la propuesta para *Pseudomona*, de ácido ferúlico pasa a vainillina, la cual puede ser oxidada a ácido vainillico y finalmente este último puede pasar a ácido protocatecuico.

El metabolismo oxidativo de compuestos ha atraído la atención. Como resultado de ataque bacteriano los compuestos aromáticos son oxidados produciendo compuestos tales como la vainillina (Otuk, 1985).

Se ha probado también la combinación de dos hongos filamentosos, *Aspergillus niger* y *Pycnoporus cinnabarinus*. En un primer paso *A. niger* transforma el ácido ferúlico en ácido vainillico y en un segundo paso el ácido vainillico es reducido a vainillina por *P. cinnabarinus* (Lesage-Messen et al 1996)

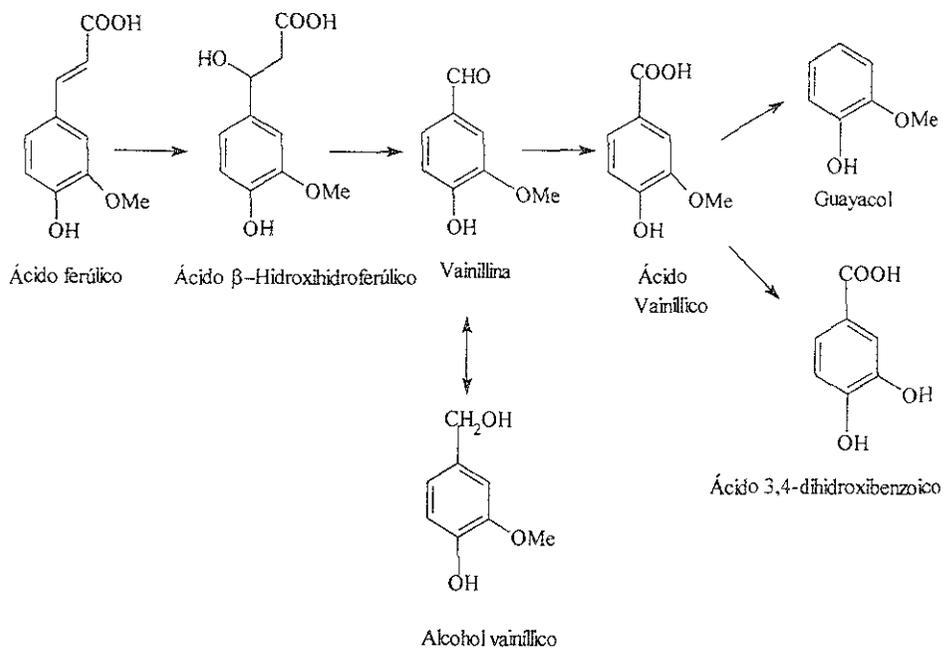


Figura 4. Ruta metabólica propuesta para el microorganismo *Streptomyces setonni*. (Muheim A. y Lerch K., 1999).

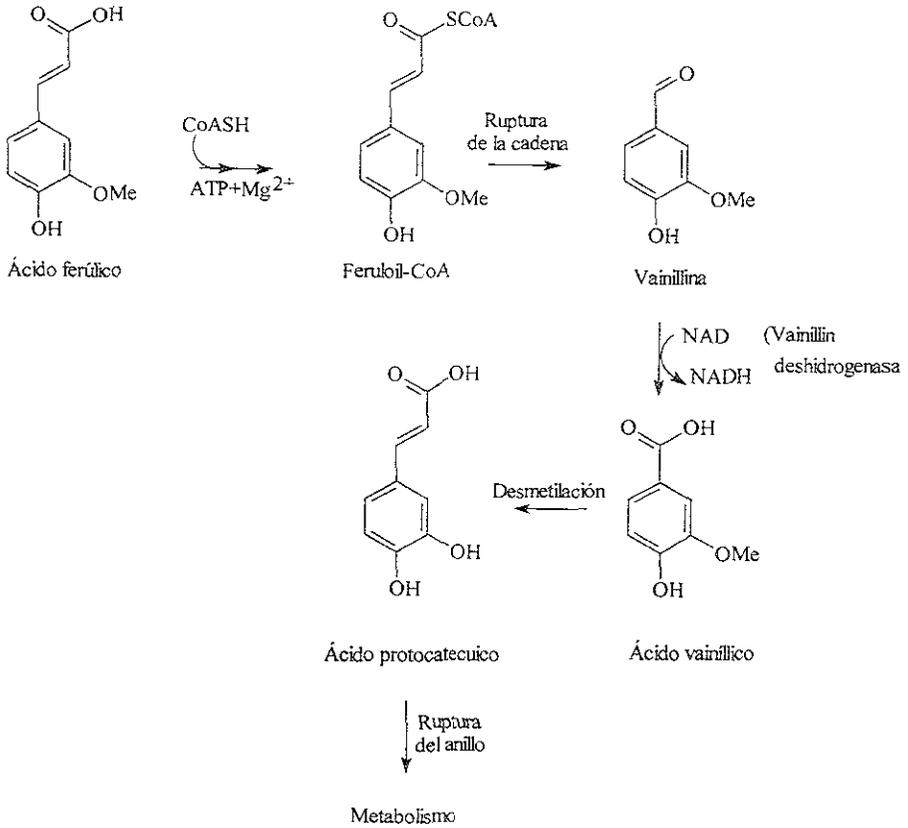


Figura 5. Ruta propuesta para el metabolismo del ácido ferúlico en *Pseudomonas fluorescens* AN103. (Narbad A., Gasson M.J., 1998)

Importancia y ventajas que posee la biotransformación para obtener vainillina natural sobre procesos convencionales

Las plantas han sido, hasta ahora, las principales fuentes para la extracción de saborizantes, medicamentos, compuestos aromáticos, etc. Existen, sin embargo, varios inconvenientes como lo son las variaciones climáticas y de estación a las que están sujetas las plantas, enfermedades de las mismas; la extracción de los compuestos de interés no siempre es sencilla y muchas veces están en bajas concentraciones.

Es por ello que se ha creado la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para la producción de estos compuestos de interés. Una de las alternativas desarrolladas es el uso de las biotransformaciones, de las cuales se derivan compuestos de interés industrial y comercial. Entre las ventajas que posee la biotransformación para la obtención de la vainillina están la satisfacción de la demanda por la vainillina natural, no se requiere de condiciones drásticas como temperatura o algún agente químico para la obtención del producto, es un método que tiene variables que pueden ser controladas.

OBJETIVOS

Generales

- Establecer un método de recuperación y/o extracción del ácido ferúlico a partir de nejayote, bagazo de caña y pulpa de café.
- Realizar la biotransformación del ácido ferúlico.

Particulares

- Comparar el rendimiento de extracción del ácido ferúlico proveniente del nejayote, utilizando una columna de carbón activado, la adición del carbón al nejayote y la extracción orgánica.
- Determinar el pH óptimo durante el proceso de recuperación a fin de extraer la mayor cantidad de ácido ferúlico.
- Comparar los rendimientos de extracción del ácido ferúlico a partir del bagazo de caña y la pulpa de café.
- Evaluar los rendimientos de vainillina obtenida a partir de la biotransformación del ácido ferúlico en presencia de una levadura.
- Comparar los rendimientos de producción de vainillina en dos medios de cultivo diferentes, uno utilizando glucosa como fuente de carbono y ácido ferúlico como sustrato para la biotransformación; contra un segundo en donde solamente se utilice el ácido ferúlico como fuente de carbono y sustrato para la biotransformación.

HIPÓTESIS

El ácido ferúlico se encuentra en las paredes celulares de las gramíneas y de casi todas las plantas, éste puede ser liberado de las paredes celulares a través de una hidrólisis, por tanto, si ésta se realiza, se podrá extraer este compuesto.

Al calentarse el maíz en presencia de 1% de cal (óxido de calcio) -proceso de nixtamalización- se lleva a cabo una hidrólisis alcalina, por lo que se podrá recuperar ácido ferúlico a partir de las aguas residuales provenientes de la elaboración de maíz nixtamalizado.

Metodología Experimental

NEJAYOTE

Recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote utilizando acetato de etilo

Se colocó 1L de nejayote, procedente de un molino de nixtamal, en un vaso de precipitado y se adicionó HCL concentrado hasta obtener un pH=4 (6 ml ácido/L nejayote) con el objetivo de acidificarlo y recuperar el ácido ferúlico. El nejayote se filtró al vacío, con un dispositivo que consistió en un mechero Buchner con un papel filtro Watman No.4 del tamaño exacto del diámetro de éste y una cama de celita seca con una altura de 1 cm. El nejayote se hizo pasar a través de dicho dispositivo para eliminar las cascarillas y la biomasa proveniente de la hidrólisis del maíz durante la nixtamalización. Se realizó la extracción orgánica del ácido ferúlico con Acetato de Etilo a través de un embudo de separación, la relación del nejayote/disolvente fue de 4:1. De la extracción se obtuvieron dos fases, la fase orgánica y la fase acuosa. Se concentró la fracción orgánica en un rotavapor Büchi waterbath B-481 con una temperatura del baño de 60°C y 150 rpm. (Véase figura 7)

BAGAZO DE CAÑA Y PULPA DE CAFÉ

Obtención del ácido ferúlico a partir de bagazo de caña y pulpa de café

Hidrólisis alcalina con NaOH 1M del bagazo de caña y la pulpa de café a 25°C, durante 24 horas

Se colocaron 25 gr de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, se adicionaron 100 ml de NaOH 1M y se dejó en agitación durante 24 horas utilizando una parrilla y agitador metálicos. La mezcla se filtró después de concluida la hidrólisis, a través de un equipo de filtrado al vacío, en el mechero Buchner se colocó un papel filtro Watman No.4 del tamaño exacto del diámetro de éste y se adicionó celita seca hasta formar una capa de 1 cm de altura, se hizo pasar la mezcla de reacción. Las aguas filtradas se acidificaron con HCl concentrado hasta obtener un pH=4 (6ml de ácido/100 ml filtrado). Se realizó la extracción orgánica del ácido ferúlico con Acetato de Etilo a través de un embudo de separación, la relación de las aguas filtradas/disolvente fue de 4:1. De la extracción se derivaron dos fases, la fase orgánica y la fase acuosa. Se concentró la fracción orgánica en un rotavapor Büchi waterbath B-481 con una temperatura del baño de 60°C y 150 rpm.(Véase figura 6).

Hidrólisis alcalina con NaOH 4M del bagazo de caña y pulpa de café a 105°C durante 20 minutos

Se colocaron 25 gr de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se le adicionaron 100 ml de NaOH 4M. El matraz fue introducido en una autoclave Hirayama HA-300 MII durante 20 minutos a una temperatura de 105°C. Se dejó enfriar la mezcla de reacción y se filtró a través de un mechero Buchner con papel filtro y una cama de celita de 1 cm de altura. Una vez filtrado, las aguas se acidificaron con HCl concentrado hasta obtener un pH=4 (7 ml ácido/100 ml filtrado). Se realizó la extracción orgánica del ácido ferúlico con Acetato de Etilo a través de un embudo de separación, la relación de las aguas recolectadas/disolvente fue de 4:1. De la extracción se obtuvieron dos fases, la fase orgánica y la fase acuosa. Se concentró la fracción orgánica en un rotavapor Buchi waterbath B-481 con una temperatura del baño de 60°C y 150 rpm. (Véase figura 6).

Detección del ácido ferúlico por cromatografía en capa fina

Una vez que se concentraron los extractos orgánicos de cada una de las extracciones y/o recuperaciones, se obtuvo un sólido amarillo-café, el cual fue disuelto en Acetato de Etilo (0.5g extracto/5ml acetato de etilo) Se preparó también un patrón de ácido ferúlico pesando 0.1 g/3 ml de Acetato de Etilo. En una placa cromatográfica Macherey-Nagel, de sílica gel 60 con indicador fluorescente UV₂₅₄ se aplicó 1 µl de cada uno de los extractos, incluido el patrón. La placa fue introducida en una cámara reveladora cuyo eluyente fue el par Acetato de Etilo:Hexano (relación 9:1). Una vez completada la elución de las muestras, la placa se observa en una cámara con una lámpara UV-Visible. Las placas fueron aspersadas con con sulfato cérico y/o DPPH para hacer visible la presencia del ácido ferúlico.

Extracción del ácido ferúlico

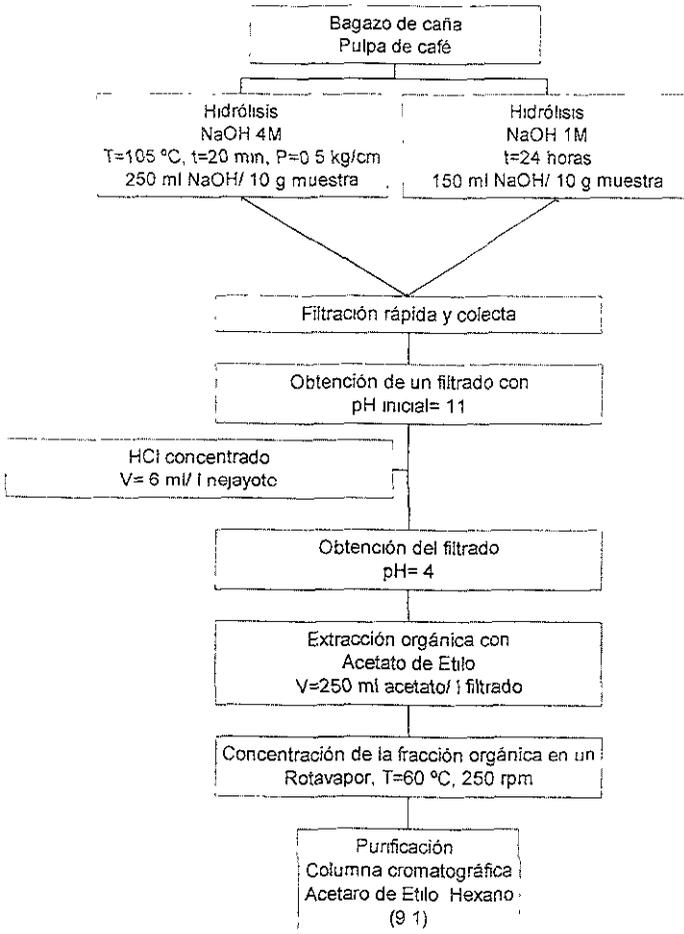


Fig.6 Diagrama general de la extracción del ácido ferúlico a partir de bagazo de caña y pulpa de café.

Purificación del ácido ferúlico a través de una columna cromatográfica

Se preparó una columna cromatográfica utilizando gel de sílice 60 Merck 3-70 mallas ASTM con indicador de humedad, la cantidad de gel de sílice que se utilizó fue en función de la cantidad de extracto obtenido de la recuperación y/o extracción; la relación fue de 10 g gel de sílice/0.5 g extracto. Los eluyentes utilizados fueron Acetato de Etilo:Hexano (9:1). El extracto seco se disolvió en acetona, siendo la mínima posible (3 ml/0.5 g extracto). La muestra se secó con celita para obtener un sólido y permitir que la muestra se desplazara por la columna lo más homogéneamente posible. Una vez que se formó el sólido se incorporó a la columna cromatográfica. Se hizo desplazar la muestra por la columna con el par de eluyentes, obteniéndose así las diferentes fracciones. El volumen de las fracciones recolectadas osciló entre los 100 y 125 mL.

Se concentraron las fracciones colectadas en el otavapor Büchi waterbath B-481 con una temperatura del baño de 60°C y 150 rpm. Se recrystalizó el ácido ferúlico a partir de las fracciones 2, 3 y 4, que es donde se detectó la mayor cantidad de ferúlico.

Recrystalización del ácido ferúlico

Una vez que se purificó el ácido ferúlico, éste se disuelve en la mínima cantidad de agua caliente (5ml/0.5g), ya disuelto, se comenzó a evaporar el agua hasta que el volumen final sea la mitad del volumen inicial (la evaporación del agua debe ser lenta y no sobrepasar los 40°C). Se dejó en reposo durante 24 horas para obtener así, los cristales de ácido ferúlico.

Evaluación de los diferentes métodos de recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote

Recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote con una columna de carbón activado

Se colocó 1L de nejayote en un vaso de precipitados y se adicionó HCl concentrado (6ml ácido/L nejayote) hasta obtener un pH=4. Se filtró el nejayote a través de un equipo al vacío (en el mechero Buchner se colocó un papel filtro Watman No.4 del tamaño exacto del diámetro de éste, se adicionó celita seca hasta formar una capa de 1 cm. de altura). Se preparó una columna cromatográfica con Carbón activado: se colocó un tapón de algodón en la boca de la columna y se agregó celita (10g/L nejayote) con la finalidad de formar un filtro y que el carbón activado no saliera de la columna. Se agregó el carbón activado a la columna (6g carbón/L nejayote). El nejayote se hizo pasar por la columna. El carbón activado se dejó secar y una vez seco, se raspó de la columna y se colocó en un cartucho de celulosa Supelco 1.5 mm grosor 43X130 mm sometiéndose a reflujo con Acetato de Etilo durante 24 horas en un Soxhlet. Se concentró la fase orgánica con un rotavapor Buchi waterbath B-481 con una temperatura del baño de 60°C y 150 rpm. (Véase figura 7)

Recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote utilizando una mezcla con carbón activado

Se colocó 1L de nejayote en un vaso de precipitados y se adicionó HCl concentrado (6ml ácido/L nejayote) hasta obtener un pH=4. El nejayote se filtró través de un equipo al vacío. A las aguas colectadas se le agregó el carbón activado (6g/L nejayote) y se revolvió con la ayuda de un agitador durante 5 minutos. La mezcla carbón/nejayote se hizo pasar por un equipo de filtrado al vacío; en el papel filtro quedó el carbón activado, se dejó secar para colocarse después en un cartucho de celulosa y en un sistema de reflujo (Soxhlet) durante 24 horas. Finalmente la fase orgánica se concentró a través de un rotavapor Buchi waterbath B-481 con una temperatura del baño de 60°C y 150 rpm.(Véase figura 7)

Recuperación del ácido ferúlico

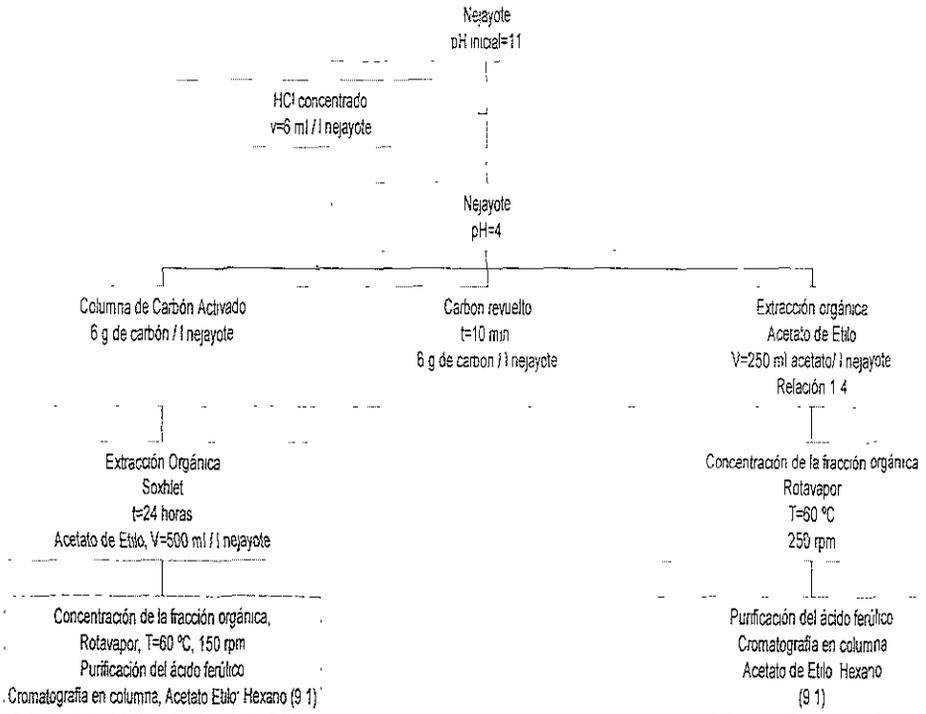


Fig.7 Diagrama general de la recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote.

SELECCIÓN DE CEPAS A PARTIR DEL NEJAYOTE, BAGAZO DE CAÑA Y PULPA DE CAFÉ

Aislamiento de microorganismos a partir de nejayote, bagazo de caña y pulpa de café

Se tomó 0.1 ml de nejayote y se sembró en los dos diferentes medios de cultivo. Se pesaron 3 gr de bagazo de caña y de pulpa de café, y cada uno de los residuos fue suspendido en agua estéril y homogenizado. A partir de esta suspensión, se tomó una muestra con un asa microbiológica estéril y se sembraron los microorganismos presentes en dos medios de cultivo. Los medios de cultivo fueron los siguientes: a) Medio Mínimo Estándar (g/L) KH_2PO_4 , 5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0.05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0.005; los elementos traza fueron EDTA, 5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2.2; CaCl_2 , 0.55; $\text{MnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.5; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.11; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.16; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.16, ácido ferúlico 0.5. El MgSO_4 , FeSO_4 y los elementos traza fueron esterilizados por separado. El ácido ferúlico fue esterilizado por filtración utilizando papel filtro millipore de $45\mu\text{m}$ de tamaño de poro (Gasson M.J., 1998). b) Medio II (g/L) NH_4Cl , 1; MgSO_4 , 0.13; KH_2PO_4 , 3; NaHPO_4 , 6; ácido ferúlico 0.5 (Turner J.A, Rice E.L., 1975). Los medios sólidos fueron preparados agregando 1.5% de agar.

Purificación de las cepas aisladas a partir del nejayote, bagazo de caña y pulpa de café

Una vez que se obtuvieron las diferentes cepas, se resembraron en el Medio II y en el Medio Mínimo Estándar sólidos, con la finalidad de obtener cada una de las cepas por separado. Se hicieron las resiembras necesarias hasta que se observó el crecimiento de un solo tipo de microorganismos en diferentes cajas.

BIOTRANSFORMACION DEL ÁCIDO FERÚLICO UTILIZANDO EL MICROORGANISMO SELECCIONADO

Crecimiento del microorganismo

El microorganismo se sembró 48 horas antes de la biotransformación en agar-papa-dextrosa (PDA); transcurrido este tiempo, las colonias se suspendieron en un tubo que contenía 30 ml de un medio rico en glucosa (extracto de levadura 1%, glucosa 1.5% y peptona 0.5%). Se incubaron durante 24 horas. El medio se centrifugó en una Centrifuga 3000 Mistral MSE durante 10 min a 2500 rpm. El sobrenadante fue desechado y las células resuspendidas en 10 ml de agua estéril, lavándose dos veces. Finalmente fueron resuspendidas en 4 ml de agua estéril.

Para el caso en el que se utilizó glucosa como fuente de carbono, las células se incorporaron a un Medio II líquido con glucosa (g/L) NH_4Cl , 1, MgSO_4 , 0.13; KH_2PO_4 , 3; NaHPO_4 , 6; glucosa 1.5%; dejándose en incubación 24 horas más antes de adicionarle el ácido ferúlico.

En el caso en que el ácido ferúlico fue la única fuente de carbono, las células se incorporaron directamente al Medio II líquido con ácido ferúlico (g/L) NH_4Cl , 1; MgSO_4 , 0.13; KH_2PO_4 , 3; NaHPO_4 , 6; ácido ferúlico 0.5., iniciándose así la biotransformación de este compuesto.

Monitoreo de los productos de la biotransformación

Se comenzó a monitorear el matraz con Medio II y ferúlico la formación de vainillina y la desaparición de ácido ferúlico durante 55 horas. El monitoreo se realizó cada 5 horas.

Para el caso del matraz que contiene glucosa una vez pasadas las últimas 24 horas en agitación, se le adicionó el ácido ferúlico (0.5g/L) previamente esterilizado y a partir de ese momento se empezó a hacer el monitoreo de la aparición de vainillina y la desaparición del ácido ferúlico durante 55 horas con un lapso entre cada muestreo de 5 horas.

Todo el proceso de biotransformación se hace por duplicado. (Véase figura 8).

Monitoreo del microorganismo durante la fermentación

Una vez que se inició la biotransformación del ácido ferúlico, cada 5 horas se realizó por el método de plaqueo la cuenta de microorganismos presentes durante la fermentación, tomando una alícuota de 1ml y aforando a 10ml con agua peptonada al 0.1%. Se realizaron diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-7} , sembrando el inóculo en agar papa dextrosa. Se incubaron las cajas a una $T=28-30$ °C durante 48 horas. Se contó el número de colonias que crecen en cada dilución

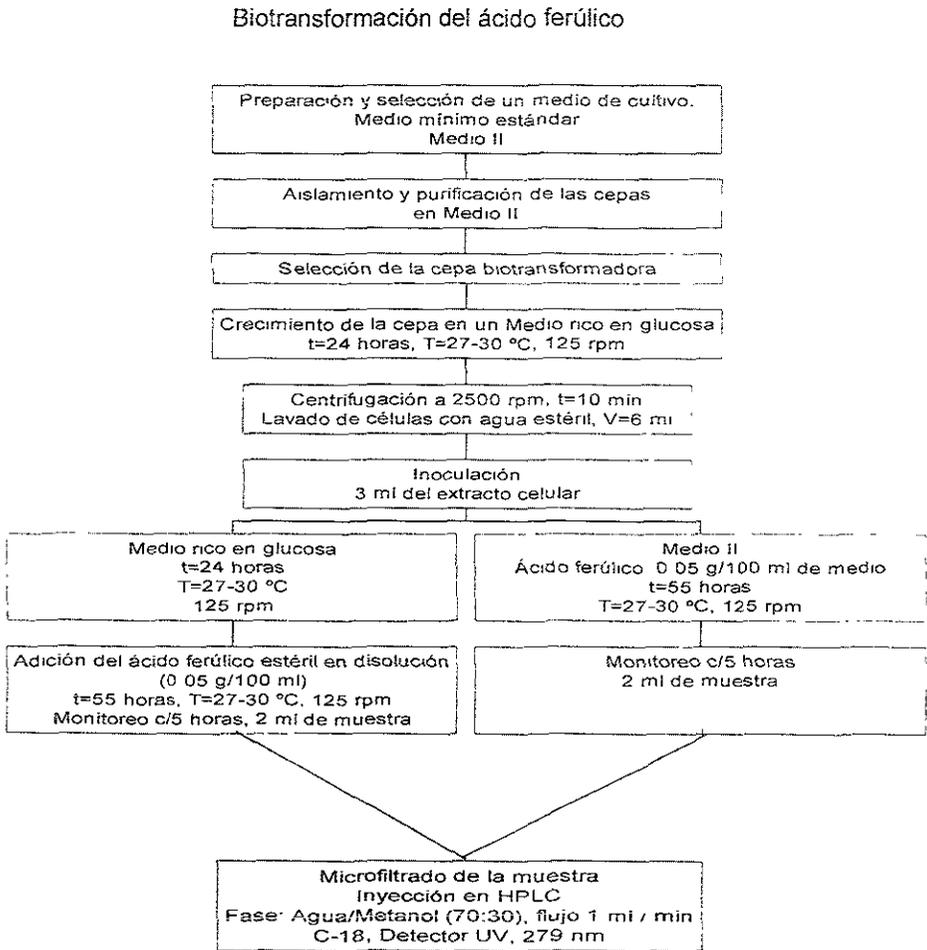


Fig.8 Diagrama general de la biotransformación del ácido ferúlico con la cepa seleccionada.

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA BIOTRANSFORMACIÓN UTILIZANDO HPLC (CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN)

La identificación y cuantificación se realizó a través de un cromatógrafo de líquidos serie 250 con bomba isocrática LC 250 y un loop de 20 μ L Perkin-Elmer, utilizando una columna C-18 Prodigy 5ODS 250X4 60 mm y 5 micrones. Un detector programable UV Waters, 486 operando en la región UV a 279 nm, un integrador personal modelo 10205. La fase móvil o eluyente utilizado fue Agua:Metanol grado HPLC, en proporción 70:30 respectivamente (Rahouti, 1989). El agua utilizada fue acidificada con 1 % de ácido acético glacial para después ajustarla a un pH=4 con NaOH al 10% y ser filtrada a través de un sistema de filtración Millipore con membrana de 0.45 micras de acetato de celulosa. La fase móvil se desgasificó en un sonicador Brasonic Ultrasonic Cleaners modelo 2210 durante 20 minutos. El flujo fue de 1.0 ml/min. El volumen de muestra inyectada fue de 20 μ l. La columna C-18 fue calentada con una mantilla eléctrica hasta alcanzar una T=34-38 °C y una presión en el cromatógrafo entre 2600-2700 psi. Al final de las inyecciones, la columna se lavó con la misma fase móvil.

Curvas de calibración

Se realizaron dos curvas de calibración, una para el ácido ferúlico y otra para la vainillina bajo las condiciones antes mencionadas. Se manejaron 5 y 7 concentraciones respectivamente; para el ácido ferúlico se manejaron 5, 4, 3, 2 y 1 μ g/ml y para la vainillina 5, 4, 3, 2, 1, 0.5 y 0.25 μ g/ml, inyectándose cada concentración por triplicado.

Cuantificación de ácido ferúlico en nejayote, bagazo de caña y pulpa de café

Preparación de la muestra

A partir de la extracción y/o recuperación se obtuvo un sólido amarillo-café, el cual se disolvió en 3ml de metanol grado HPLC.

Inyección de la muestra

A partir de la disolución del extracto, se tomó una alícuota de 0.1 ml y se aforó a 10ml con metanol. La inyección de estas muestras se hizo a partir de la solución aforada. El volumen inyectado fue de 20 μ L.

Una vez que se obtuvieron al menos dos repeticiones de cada muestra, se incluyó en la siguiente inyección un patrón interno de ácido ferúlico, con la finalidad de rectificar el tiempo de retención de este compuesto en el gráfico. Se tuvieron como mínimo 2 repeticiones por muestra.

Cálculo de la concentración

Una vez que se obtuvieron los tiempos de retención para el ácido ferúlico, se determinaron las áreas correspondientes y a través de la ecuación de la curva patrón para el ácido ferúlico, se extrapolaron las áreas, obteniéndose una concentración, multiplicando después por los factores de dilución se obtuvo la concentración real.

Cuantificación de la vainillina como producto de la biotransformación y del ácido ferúlico como sustrato de ésta

Preparación de la muestra

En cada tiempo de monitoreo en la fermentación, se sustrajeron aproximadamente 2 ml del medio de cultivo, los cuales se filtraron a través de un filtr millipore de 0.2 μm con la finalidad de eliminar los microorganismos presentes en la muestra.

Inyección de la muestra

En el caso del medio de cultivo que sólo contiene el ácido ferúlico como fuente de carbono la inyección fue directa, es decir, no hubo la necesidad de hacer dilución.

En cambio para el medio de cultivo que contiene glucosa y ácido ferúlico como fuentes de carbono se tomó una alícuota de 0.1 ml y se aforó a 10 ml con agua desionizada, microfiltrada y destilada. El mínimo de repeticiones fue de 2 por cada muestra y el volumen inyectado fue de 20 μL .

Estas muestras también fueron inyectadas con un patrón interno para cada uno de los compuestos, teniéndose como mínimo 2 repeticiones por muestra.

Cálculo de la concentración

Se identificaron los tiempos de retención para cada compuesto y su respectiva área. Utilizando la ecuación correspondiente para cada compuesto, se extrapoló en cada una de las curvas patrón el área y se obtuvo una concentración, la cual se multiplicó por los factores de dilución en caso de existir para obtener finalmente la concentración real de vainillina y ácido ferúlico.

Resultados y Discusión

Obtención del ácido ferúlico a partir del bagazo de caña y pulpa de café

Para la obtención del ácido ferúlico se utilizaron dos condiciones de hidrólisis, una ya se había utilizado para extraer este compuesto a partir de suelo (Guenzi y McCalla, 1966) y la otra se probó para extraerlo a partir de maíz (Classen, 1989). Estas dos condiciones se tomaron como referencias, sin embargo, la metodología no fue la misma. Se varió la concentración de alcali y el tiempo de hidrólisis, con el fin de obtener condiciones experimentales de acuerdo a los sustratos que se utilizaron y en miras de poder escalar el procedimiento.

Obtención del ácido ferúlico a partir de bagazo de caña

En la Tabla 4 se observa que la cantidad de ferúlico extraído fue mayor utilizando NaOH 4M en un periodo de 15 minutos que con NaOH 1M durante 24 horas. Desde un principio se descartó la hidrólisis ácida, ya que la nixtamalización es una hidrólisis alcalina del grano y no una hidrólisis ácida, además de que los rendimientos reportados son muy bajos. No existe una referencia para comparar con los datos obtenidos, ya que no se han hecho estudios del bagazo de caña como fuente para la obtención de ácido ferúlico.

Se ha estudiado la melaza de caña como una fuente del ácido ferúlico, encontrándose que este compuesto puede estar presente en una proporción de hasta 4.7 % (Guillon F., Thibault J-F. 1989).

Por otro lado, según informes de la SAGAR, en el año 2000 la producción de caña de azúcar fue de 29,098,114 miles de toneladas, de las cuales sólo un 20% o menos se transforma en azúcar, quedando alrededor de 23,278,491 miles de toneladas como residuo agroindustrial. Si nosotros extrapolamos los resultados

Resultados y Discusión

Obtención del ácido ferúlico a partir del bagazo de caña y pulpa de café

Para la obtención del ácido ferúlico se utilizaron dos condiciones de hidrólisis, una ya se había utilizado para extraer este compuesto a partir de suelo (Guenzi y McCalla, 1966) y la otra se probó para extraerlo a partir de maíz (Classen, 1989) Estas dos condiciones se tomaron como referencias, sin embargo, la metodología no fue la misma. Se varió la concentración de alcali y el tiempo de hidrólisis, con el fin de obtener condiciones experimentales de acuerdo a los sustratos que se utilizaron y en miras de poder escalar el procedimiento.

Obtención del ácido ferúlico a partir de bagazo de caña

En la Tabla 4 se observa que la cantidad de ferúlico extraído fue mayor utilizando NaOH 4M en un periodo de 15 minutos que con NaOH 1M durante 24 horas. Desde un principio se descartó la hidrólisis ácida, ya que la nixtamalización es una hidrólisis alcalina del grano y no una hidrólisis ácida, además de que los rendimientos reportados son muy bajos. No existe una referencia para comparar con los datos obtenidos, ya que no se han hecho estudios del bagazo de caña como fuente para la obtención de ácido ferúlico.

Se ha estudiado la melaza de caña como una fuente del ácido ferúlico, encontrándose que este compuesto puede estar presente en una proporción de hasta 4.7 % (Guillon F., Thibault J-F. 1989).

Por otro lado, según informes de la SAGAR, en el año 2000 la producción de caña de azúcar fue de 29,098,114 miles de toneladas, de las cuales sólo un 20% o menos se transforma en azúcar, quedando alrededor de 23,278,491 miles de toneladas como residuo agroindustrial. Si nosotros extrapolamos los resultados

y los llevamos a gran escala, tendríamos que se podrían obtener alrededor de dos toneladas de ácido ferúlico provenientes de este residuo. Sin embargo esta cantidad no es considerable, ya que sólo se obtuvo un 0.003% de ferúlico, en cambio, en las melazas el porcentaje es mucho más alto, pudiéndose considerar como una mejor fuente de extracción de este compuesto.

Obtención del ácido ferúlico a partir de pulpa de café

En la Tabla 4 se puede observar que la cantidad de ácido ferúlico extraída fue mayor utilizando NaOH 1M durante 24 horas que la cantidad obtenida con NaOH 4M durante 15 minutos. De hecho se observa un incremento tres veces mayor.

No existen datos o referencias de la utilización de este residuo como una fuente de ácido ferúlico. Según informes de la SAGAR la producción de café en el año 2000 fue de 1,985,866 miles de toneladas. Dicho peso se refiere al grano de café en su forma comerciable, sin embargo, este dato es aproximadamente el 30% del peso total del café, ya que durante el proceso para obtener el grano se desecha alrededor de un 70% de su peso, incluyendo la pulpa, mucilago y las mismas cascarillas del café, generando así, alrededor de 6,619,533 miles de toneladas de residuos, de los cuales se podrían extraer alrededor de 139 kg de ácido ferúlico. Por esta cifra, la pulpa de café tampoco se podría considerar como una fuente potencial de ácido ferúlico.

Ahora bien, si nosotros comparamos la cantidad de ácido ferúlico extraídos del bagazo de caña y de la pulpa de café, podemos ver el primero contiene mayor cantidad de ferúlico, y que dicho compuesto se puede extraer a través de una hidrólisis con una concentración de álcali mayor durante un tiempo relativamente corto y una temperatura elevada.

Sustrato	Concentración NaOH	Temperatura	Tiempo	Concentración de ácido ferúlico (g/g muestra)
Bagazo de caña	4M	105°C	20 minutos	0.00009
Bagazo de caña	1M	25°C	24 horas	0.000000048
Pulpa de café	4M	105°C	20 minutos	0.00001
Pulpa de café	1M	25°C	24 horas	0.00003

Tabla 4. Extracción del ácido ferúlico a partir de bagazo de caña y pulpa de café

Evaluación de los diferentes métodos de recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote

La recuperación del ácido ferúlico a partir de nejayote se hizo a través de tres diferentes métodos: una columna de carbón activado, la adición de carbón al nejayote y una extracción orgánica con acetato de etilo. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

Método	Cantidad de ácido ferúlico (gramos/litro)
Columna de carbón activado	0.6397
Carbón revuelto	0.4265
Extracción orgánica	0.5077

Tabla 5. Comparación de los diferentes métodos utilizados para recuperar el ácido ferúlico a partir de nejayote

Se observó que utilizando una columna de carbón activado se obtuvo una mayor cantidad de ácido ferúlico debido a que el empaquetamiento de la columna permite que haya una absorción del ácido reduciendo pérdidas. La extracción orgánica tiene que realizarse en cualquiera de los dos procesos donde se utiliza carbón activado, por tanto, si se comparan los rendimientos de los métodos con carbón activado y la extracción orgánica se observa que ésta última es mejorada en rendimiento sólo por la columna de carbón activado; es decir, de cualquier manera la extracción orgánica es imprescindible así que el rendimiento mejora solamente a través de la columna de carbón.

Se monitoreó la cantidad de carbón activado necesaria para absorber una cantidad conocida de ácido ferúlico por lo que se determinó la cantidad de carbón activado necesaria para absorber el ácido ferúlico presente en el nejayote. Así se obtuvo que 6 gramos de carbón por litro de nejayote aseguraba la completa absorción de ácido ferúlico por parte del carbón activado.

A manera de eficientar el proceso de recuperación del ácido ferúlico ya sea a partir de nejayote o a partir de la extracción del mismo, un factor importante que se consideró fue el pH, ya que es necesario acidificar las aguas colectadas para que el ferulato (que es la forma en que se encuentra el ácido ferúlico a pH alcalino) pase a ácido ferúlico. A través de HPLC se determinó la cantidad de ácido ferúlico presente en el nejayote a diferentes pH. Se utilizaron diferentes valores de pH: 2,3,4,5,6 y 7, encontrándose que la mayor concentración de ácido ferúlico se obtenía a un pH de 4.

Si nosotros comparamos el rendimiento del nejayote contra el del bagazo de caña o la pulpa de café, podemos observar que la mejor fuente para la obtención del ácido ferúlico es el nejayote, teniendo por si mismo otra ventaja sobre los otros sustratos y esta es el que no es necesario que se haga la hidrólisis del maíz ya que en el proceso de nixtamalización se lleva a cabo; teniéndose en las aguas residuales de este proceso el ácido ferúlico como un subproducto.

Aislamiento de las cepas a partir de nejayote, bagazo de caña y pulpa de café.

Se aislaron 4 diferentes microorganismos en un medio con ácido ferúlico como única fuente de carbono, de los cuales, tres fueron hongos filamentosos y uno fue levadura. En la Tabla 6 se muestran las características de cada uno de los microorganismos aislados en Medio II.

Microorganismo	Características del crecimiento en Medio II líquido.	Características en Medio II sólido.
Hongo filamentosos	Se observaron pelets de color café, pequeños y compactos, los cuales formaban un halo del mismo color alrededor del matraz.	Hongo filamentosos color gris.
Hongo filamentosos	Se observaron pelets de color café muy bien definidos, de tamaño regular, formaron una estela en el medio de cultivo y un halo del mismo color alrededor del matraz	Hongo filamentosos color verde-pardo
Hongo filamentosos	Se observaron pelets de color café, son muy pequeños y no son uniformes ni compactos, hubo aglomeración de los pelets para formar un agregado más largo	Hongo filamentosos color verde hoja
Levadura	Se observa el crecimiento por la turbidez del medio de cultivo	Levadura color rosa, con consistencia cremosa, forma colonias de tamaño regular.

Tabla 6. Características de los microorganismos aislados a partir de nejayote, sembrados en Medio II (g/L) NH₄Cl, 1; MgSO₄, 0.13; KH₂PO₄, 3; NaHPO₄, 6; ácido ferúlico 0.5 (Turner J.A, Rice E.L., 1975)

Se eligió trabajar con la levadura básicamente por dos motivos: 1) el tiempo de crecimiento que presenta una levadura es menor al de un hongo, por tanto el tiempo de fermentación se ve disminuido; 2) la seguridad toxicológica de los productos de la biotransformación, ya que se considera a la mayoría de las levaduras como GRAS, asegurando así una baja toxicidad en los procesos en que participan, teniendo un bioproducto no tóxico.

Biotransformaciones utilizando el microorganismo aislado

Una vez elegida la cepa, ésta se hizo crecer en el Medio II y en el Medio Mínimo Estándar, encontrándose que en el Medio II el crecimiento de la levadura era mayor, indicado principalmente por la turbidez del medio.

Se probaron dos condiciones de crecimiento, en la primera la cepa se hizo crecer en un medio rico en glucosa durante 48 horas y cumplido este tiempo se le adicionó el ácido ferúlico, la segunda condición fue el crecimiento de la cepa en un medio rico en glucosa durante 24 horas para después ser incorporada a el Medio II con ácido ferúlico como única fuente de carbono.

- **Curvas de calibración del ácido ferúlico y de la vainillina**

Se tomó como referencia una concentración máxima de $5\mu\text{g/ml}$, ya que esta es la concentración inicial según la formulación del medio de cultivo, por lo que es la concentración máxima que puede alcanzar la vainillina. Las concentraciones de vainillina varían entre los $5\mu\text{g/ml}$ hasta los $0.25\mu\text{g/ml}$, escogiéndose para la vainillina concentraciones más pequeñas que pudieran ser detectables en el HPLC.

Cuantificación de la vainillina como producto de la biotransformación a partir de ácido ferúlico

Una vez realizadas las biotransformaciones se obtuvieron los siguientes resultados:

- a) Para el caso de la biotransformación realizada en un Medio II con glucosa, los datos son los siguientes.

Tiempo de fermentación (horas)	Concentración de vainillina ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración de ácido ferúlico ($\mu\text{g/ml}$)
0	-----	7.5070
5	0.00367	5.4753
10	0.05507	3.4482
19	0.00615	0.9342
24	0.00758	0.8850
31	0.00903	0.5957
36	0.00372	0.6545
45	0.03265	0.2426
50	0.02376	0.4388
55	0.04022	0.2206

Tabla 7. Concentración de vainillina y desaparición del ácido ferúlico durante la biotransformación en un Medio II con glucosa

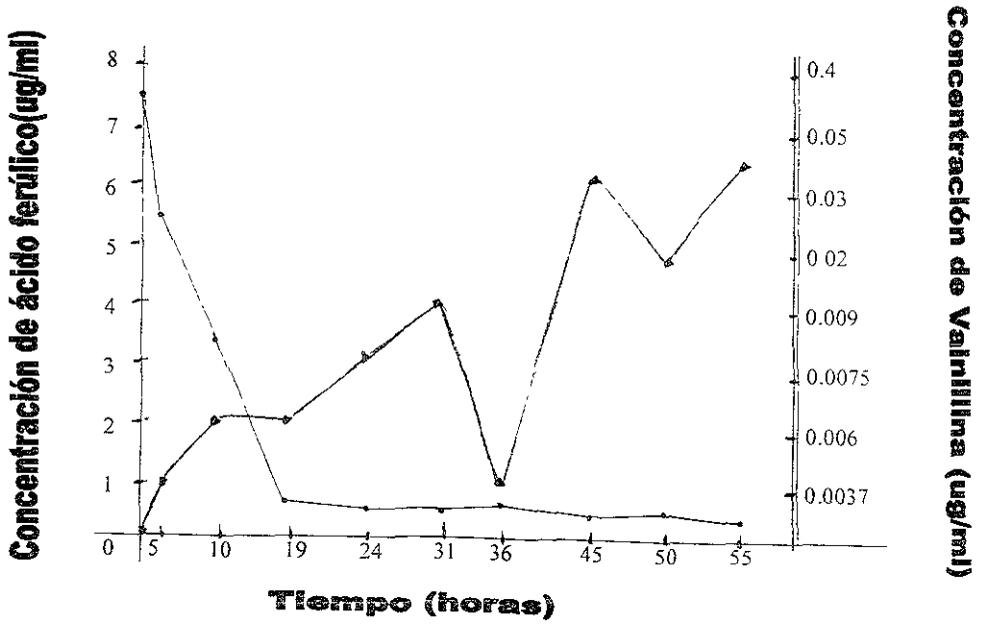


Figura 9. Curva de aparición de vainillina y desaparición de ácido ferúlico durante la biotransformación en un Medio II con glucosa

Se observó que la mayor producción de vainilla se alcanza en el tiempo 3, esto es a las 10 horas de iniciada la biotransformación a partir de este momento hay un descenso en la concentración de vainillina hasta que se incrementa nuevamente a las 45 horas y posteriormente a las 55 horas. La cantidad de biomasa presente en las 10 horas de fermentación fue de $9.10E6$ UFC/ml.

Durante el descenso marcado, en los cromatogramas del HPLC aparecen otros picos representativos que no corresponden a la vainillina. Estos otros posibles compuestos podrían ser ácido vainílico o alcohol vainílico (Muheim A y Lerch K., 1999; Narbad A., Gasson M.J., 1998)

La curva de la concentración del ácido ferúlico va en descenso todo el tiempo, lo que indica que el microorganismo está utilizando el ácido ferúlico como un sustrato para la biotransformación, rectificándose esto en la aparición de vainilla y de otros compuestos presentes en los cromatogramas, sin embargo, también podría estar tomándolo como fuente de carbono, sin embargo al termino de la fermentación no desaparece totalmente el ácido ferúlico y si aparecen otros compuestos.

Resultados y Discusión

Para el caso de la biotransformación donde sólo se utilizó el ácido ferúlico como única fuente de carbono, se obtuvieron los siguientes datos.

Tiempo de fermentación (horas)	Concentración de vainillina ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración de ácido ferúlico ($\mu\text{g/ml}$)
0	-----	7.3965
5	-----	6.0994
10	0.0068	5.1387
19	0.0043	0.0014
24	0.0069	0.0058
31	0.0189	0.0004
36	0.0038	0.0014
45	0.0168	0.0024
50	0.0277	0.0043
55	0.0113	0.0053

Tabla 8. Concentración de vainilla y de ferúlico presentes durante la biotransformación en un Medio II.

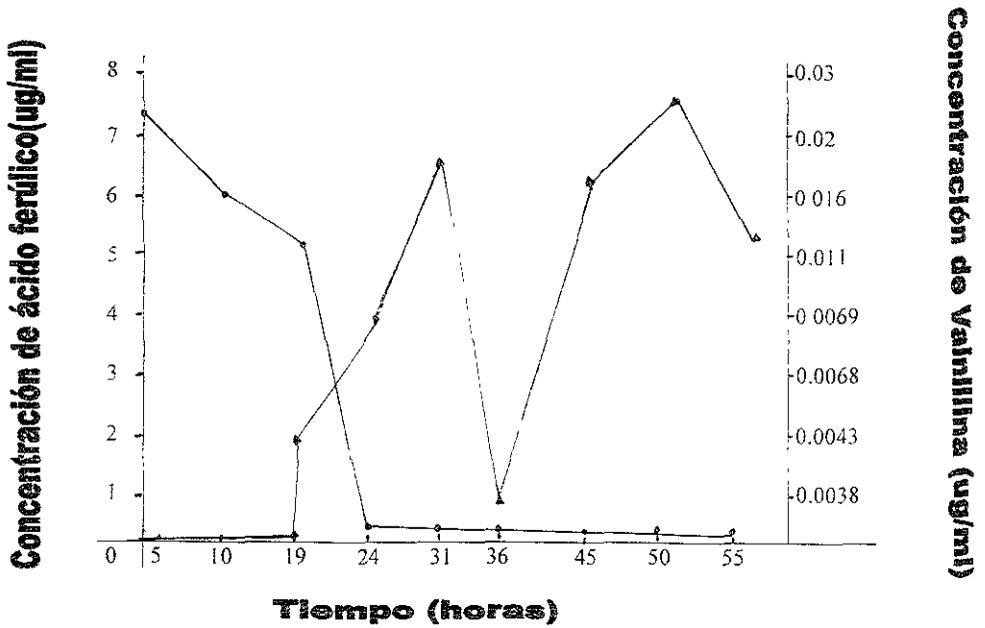


Figura 10. Curva de aparición de vainilla y desaparición de ácido ferúlico durante la biotransformación en un Medio II

En este gráfico se observa que la producción de vainilla es mínima, casi nula y el consumo de ácido ferúlico es total. La mayor producción de vainilla se obtiene a las 55 horas de fermentación, con una biomasa de $8.55E6$. Esto se debe a que el ácido ferúlico es utilizado únicamente como fuente de carbono, lo que impide que haya su biotransformación de una manera significativa, lo que si se observó es un crecimiento de la cepa en este medio, se partió de $5.34E7$ UFC/ml y se llegó a un crecimiento máximo de $1E8$ UFC/ml a las 19 horas. A partir de este momento la cantidad de microorganismos disminuye, cayendo drásticamente a partir de las 31 horas que es donde el ácido ferúlico presenta las concentraciones más bajas.

Si comparamos las dos condiciones bajo las que se realizaron las biotransformaciones se deduce que si la biotransformación se lleva a cabo teniendo a la cepa 48 horas en crecimiento con glucosa se obtienen mejores rendimientos de producción de vainillina. Se obtiene el doble de la cantidad de vainillina que en el Medio II y en menos de la mitad del tiempo. Es decir, en 10 horas de biotransformación se obtiene la mayor cantidad de vainillina en un Medio II con glucosa.

Conclusiones

Se logró realizar la extracción de ácido ferúlico a partir de bagazo de caña y pulpa de café, determinándose la cantidad de éste ácido presente en cada uno de los residuos agroindustriales.

A partir del nejayote se cuantificó y recuperó el ácido ferúlico, utilizando tres métodos diferentes (columna de carbón activado, la adición de carbón y la extracción orgánica), concluyendo que la extracción orgánica es imprescindible, mejorándose el rendimiento de ésta sólo si se utiliza la columna de carbón activado. Para este objetivo se determinó el pH óptimo de recuperación.

De los tres desechos agroindustriales utilizados en este trabajo se deriva que el que presenta mayor potencial para la extracción de ácido ferúlico es el nejayote, teniendo aproximadamente 5,000 veces más cantidad de ácido ferúlico que el bagazo de caña o la pulpa de café. Estas dos últimas fuentes no representan una fuente considerable para la extracción de este antioxidante.

Se logró la biotransformación del ácido ferúlico a vainillina con la levadura aislada, encontrándose que la cantidad de este compuesto es el doble si la cepa crece previamente en glucosa durante 48 horas antes de la adición del ácido ferúlico.

De acuerdo a la hipótesis planteada se puede decir que el ácido ferúlico es liberado a través de una hidrólisis, en el caso del maíz, se libera durante la nixtamalización; y en ambos casos pudo ser recuperado.

Conclusiones

De este trabajo se desprende la posibilidad de utilizar los residuos agroindustriales como una fuente para la obtención de compuestos con un valor agregado como sería el caso de la vainillina en un tiempo óptimo.

Recomendaciones

Se sugiere que se analicen otras posibles fuentes de ácido ferúlico como lo son el trigo, el arroz, la avena, el centeno, la cebada y el bambú partiendo ya sea de los desechos derivados de estas fuentes o de éstas mismas.

Se recomienda evaluar los parámetros que intervienen en la biotransformación del ácido ferúlico.

Se sugiere determinar la concentración óptima de ácido ferúlico presente en el medio de cultivo con la finalidad de evitar la inhibición microbiana.

Se recomienda evaluar los rendimientos de producción una vez que se tengan evaluados los parámetros de fermentación.

Akileswaran A., Brock B.J., Cereghino, J.L., 1999. 1,4-Benzoquinone Reductase from *Phanerochaete chysosporium*: cDNA Cloning and Regulation of Expression. *Applied and Environmental Microbiology*, **5**,2, 415-421.

Alfermann, A., Reinhard, E. 1980, Biotransformación by Plant Tissue Cultures. *Bulletin de la Société Chimique de France*,1-2, II-35_II-44.

Andreoni V., Bernasconi S., Bestetti G. 1995. Biotransformation of Ferulic Acid and Related Compounds by Mutant Strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Microbiological Biotechnology*. **42**,830-835.

Barghini P., Montebove F. Ruzzi M., Schiesser A. 1998. Optimal Conditions for Bioconversion of Ferulic Acid into Vanillic Acid by *Pseudomonas fluorescens* LBF13 cells. *Applied of Microbiology Biotechnology*, **49**, 309-314.

Bartolomé,B., Faulds C.B., Kroon P.A. Waldron K., Gilbet H.J., Hazlewood G., Williamson G. 1997. An *Aspergillus niger* Esterase (Ferulic Acid Esterase III) and a Recombinante *Pseudomonas fluorescens* subsp. cellulosa Esterase (XylID) Release a 5-5' Ferulic Dehydrodimer (Diferulic Acid) from Barley and Wheat Cell Walls. *Applied and Enviromental Microbiology*,**63**,1,208-212.

Bartolomé,B., Faulds, C.B., Williamson G. 1997. Enzymic Release of Ferulic Acid from Barley Spent Grain. *Journal of Cereal Science*, **25**, 285-288.

Böckle, B., Martínez, M.J., Guillén F., Martínez A.T.1999 Mechanism of Peroxidase Inactivation in Liquid Cultures of the Ligninolytic Fungus *Pleurotus pulmonarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 3, 923-928.

- Brezillon C., Kroon P.A., Faulds C.B. Brett G.M. Williamson G. 1996. Novel Ferulic Acid Esterases are Induced by Growth of *Aspergillus niger* on Sugar-beet Pulp. *Applied Microbiology Biotechnology*, **45**, 371-37.
- Civolani C., Baarghini P., Roncetti A.R., Ruzzi M., Schiesser A. 2000. Bioconversion of Ferulic Acid into Vanillic Acid by Means of a Vanillate-Negative Mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Environmental Microbiology*, 2311-2317
- Classen, D., Arnason, J.T., Serratos J.A., Lambert, J.D.H., Nozzolillo C., Philogene B.J.R. 1990. Correlation of Phenolic Acid Content of Maize to Resistance to *Sitophilus zemais*, the Maize Weevil, in Cimmyt's Collections. *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 2, 301-315.
- Chen J., Fales S.L., Varga G.A., Royses D.J. 1996 Biodegradability of Free Monomeric and Cell-Wall-Bound Phenolic Acids in Maize Stover by Two Strains of White-Rot Fungi. *Journal Science of Food Agriculture*, **71**, 145-150.
- Danner H., Braun R. 1999 Biotechnology for the Production of Commodity Chemicals from Biomass. *Chemical Society Rev*, **28**, 395-405.
- Dapkevicius A., Venskutonis R., van Beek T.A., Linssen J.P. 1998. Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *Journal of Science Food Agriculture*, **77**, 140-14.
- Delneri D., Degrassi G., Rizzo R., Bruschi C.V. 1995. Degradation of trans-ferulic and p-coumaric acid by *Acinetobacter calcoaceticus* DSM 58. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1244**, 363-367.

DiCosmo, F., Facchini P.J., Kraml M.M. 1989. Cultured Plants Cells-the chemical factory within. *Chemistry in Britain*, 101-103

Dimberg L.H., Molteberg E.L., Solheim R., Frolich W. 1996. Variations in Oat Groats Due to Variety, Storage and Heat Treatment. I: Phenolic Compounds. *Journal of Cereal Science*, 24, 263-272.

Dobhal M.P., Hasan A.M. Sharma M.C. Joshi B.C. 1999. Ferulic Acid Esters from *Plumeria bicolor*. *Phytochemistry*, 51, 319-321.

Donaghy J., Kelly P.F. McKay A. M. 1998. Detection of Ferulic Acid Esterase Production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli*. *Applied Microbiological Biotechnology*, 50, 257-260.

Enoki A., Yajima Y., Gold M.H. 1981. Olefin Saturation and Acid Reduction of 3,4-Dimethoxycinnamic Acid and Derivatives by *Phanerochaete Chrysosporium*. *Phytochemistry*, 20, 7, 1543-1546.

Falconnier B., Lapierre C., Lesage-Meessen L., Yonnet G., Brunerie P., Colonna-Ceccaldi B., Corrieu G., Asther M. 1994. Vanillin as a Product of Ferulic Acid Biotransformation by the White-Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus* Y-937: identification of Metabolic Pathways. *Journal of Biotechnology*, 37, 123-132.

Fry, Stephen. 1982. Phenolic Components of the Primary Cell Wall. *Journal of Biochemistry*, 203, 493-504.

García B.L., Balla A.S., Rodríguez J., Pérez-Leblic M.I., Arias M.E. Copatiño J.L. 1998. Production and Characterization of Ferulic Acid Esterase Activity in Crude Extracts by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. *Applied Microbiology Biotechnology*, **50**, 213-218.

Gasson M.J., Kitamura Y., McLaughlan W.R., Narbad A., Parr A.J., Parsons E.L.H., Payne J., Rhoedes J.C., Walton N.J. 1998 Metabolism of Ferulic Acid to Vanillin. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**, 7, 4163-4170.

Grabber H.J., Hatfield R.D., Ralph J., Zof J., Amrheins N. 1995 Ferulate Cross-Linking in Cell Walls Isolated from Maize Cell Suspensions. *Phytochemistry*, **40**, 4, 1077-1082.

Guillon F., Thibault J-F. 1989. Enzymic Hydrolysis of the 'Hairy' Fragments of Sugar-Beet Pectins. *Carbohydrate Research*, **190**, 97-108.

Guillon F., Thibault J-F. 1989. Methylation Analysis and Mild Acid Hydrolysis of the 'Hairy' Fragments of Sugar-Beet Pectins. *Carbohydrate Research*, **190**, 85-96.

Hartley R.D., Jones E.C. 1977. Phenolic Components and Degradability of Cell Walls of Grass and Legume Species. *Phytochemistry*, **16**, 1531-1534.

Hartley R.D., Morrison III W.H., Himmelsbach D.S., Borneman W.S. 1990. Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry* **29**, 3705-3709.

- Huang Z., Dostal L., Rosazza J.P.N. 1993. Mechanisms of Ferulic Acid Conversions to Vanillic Acid and Guaiacol by *Rhodotorula rubra*. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**, 232, 23954-23958.
- Iiyama K., Tuyet T.,B., Stone B.A. 1990. Phenolic Acid Bridges Between Polysaccharides and Lignin in Wheat Internodes. *Biochemistry*, **29**, 3, 733-737.
- Ishii T., Hiroi T. 1990. Linkage of Phenolic Acids to Cell-Wall polysaccharides of Bamboo Shoot. *Carbohydrate Research*, **20**,297-310.
- Krings U. Berger R.G. 1998. Biotechnological Production of Flavours and Fragrances. *Applied Microbiological Biotechnology*, **49**, 1-8.
- Kroon P.A., Williamson G., 1999. Hidroxicinnamates in plants and food: currents and future perspectives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **79**,355-361.
- Lam T.B.T., Iiyama K, Ston B.A. 1992. Cinnamic Acid Bridges Between Cell Wall Polymers in Wheat and Phalaris Internodes.*Phytochemistry*, **31**, 4, 1179-1183.
- Larson R.A. 1998 The Antioxidants of Higher Plants. *Phytochemistry*, **27**, 4, 969-978.
- Lempeur I, Rouau X, Abecassis J. 1995 Genetic and Agronomic Variation in Arabinoxylan and Ferulic Acid Contents of Durum Weath (*Triticum durum* L.) Grain and Its Milling Fractions. *Journal of Cereal Science*, **25**, 103-110.
- Lerch, K., Muheim A. 1999 Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Applied Microbiological Biotechnology*, **51**, 456-461.

- Lesage-Meessen L., Delattre M., haon M., Thibault J-F., Ceccaldi B.C., Brunerie P., Asther M. 1996. A Two-Step Bioconversion Process for Vanillin Production From Ferulic Acid Combining *Aspergillus niger* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnology*, **50**, 107-113.
- Li T., Rozzasa J,P.N. 2000, Biocatalytic Synthesis of Vanillin. *Applied and Environmental Microbiology*, 684-687.
- Liyama K., Lam T.B-T., Ston B.A. 1994. Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiology*, **104**,315-320.
- Lomaascolo A. Stenlaire C., Asther M., Lesage-Meessen L. 1999 Basidiomycetes as New Biotechnological Tools to Generate Natural Aromatic Flavour for the Food Industry. *Trends in Biotechnology*, **17**, 282-289.
- Lozovaya V.V., Grshkova T.A., Yablokova E.V., Rummyantseva N.I., Valieva A., Ulanov A., Widholm J.M. 1999. Cold Alkali can Extract Phenolic Acids that are Ether Linked to Cell Wall Components in Dicotyledonous Plants (Buckwheat, Soybean and Flax). *Phytochemistry*, **50**, 395-400.
- Lutz-Wahl S., Fischer P., Schimidt-Dannert C., Wohlleben W., Hauer B., Schmid R. 1998. Stereo- and Regioselective Hydroxylation of α -Ionone by *Streptomyces* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 3878-3881.
- Micard V., Grabber J.H., Ralph J., Renard C.M.G. C., Thibault J-F.1997. Dehydrodiferulic Acids From Sugar -Beet Pulp. *Phytochemistry*, **44**,7, 135-138.

- Muheim, A., Lerch K. 1999. Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Applied Microbiological Biotechnology*, **51**, 456-461.
- Nali M, Rindone B., Tollari S., Andreoni V., Treccani V. 1984. Anaerobic Microbial Conversion of Three Hydroxycinnamic Acids. *Experimental*, **41**, 1351-1353.
- Narbad A., Gasson M.J. 1998. Metabolism of Ferulic Acid Via Vanillin Using a Novel CoA-dependent pathway in a Newlyisolated Strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, **144**, 1397-1405.
- Negrel J., Pollet B., Lapierre C. 1996. Ether-Linked Ferulic Acid Amides in Natural and Wound Periderms of Potato Tuber. *Phytochemistry*, **43**, 1195-1199.
- Nierop G.M.N., Bont J.A.M., 1998. Conversion of Phenylalanine to Benzaldehyde Initiated by an Aminotrasferase in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 3009-3013.
- Nishida A., Fukuzumi T. 1978. Formation of Coniferyl Alcohol From Ferulic Acid by the White Rot Fungus *Trametes*. *Phytochemistry*, **17**, 417-419.
- Ötük, G., 1985. Degradation of Ferulic Acid by *Escherichia coli*. *Jornal of Fermentation Technology*, **63**, 501-506.

Overhage J., Kresse A.U., Priefert H., Sommer H., Krammer G., Rabenhorst f.J., Steinbuechel A., 1999. Molecular Characterization of the Genes *pcaG* and *pcaH*, Encoding Protocatechuate 3,4-Dioxygenase, Which Are Essential for Vanillin Catabolism in *Pseudomonas sp.* Strain HR199. *Applied and Environmental Microbiology*, 951-960.

Peng X., Masai E., Katayama Y., Fukuda M. 1999. Characterization of the meta-Cleavage Compound Hydrolase Gene Involved in Degradation of the Lignin-

Rabenhorst J. 1996. Production of Methoxyphenol-type Natural Aroma Chemicals by Biotransformation of Eugenol with a New *Pseudomonas sp.* *Applied of Microbiological Biotechnology*, 46, 470-474.

Rahouti M., Seigle-Murandi F., Steiman R., Eriksson K-E. 1989. Metabolism of Ferulic Acid by *Paecilomyces variotii* and *Pestalotia palmarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55,9, 2391-2398.

Ralet M-C., Faulds C.B., Williamson G., Thibault J-F. 1994. Degradation of Feruloylated Oligosaccharides from Sugar-Beet Pulp and Wheat Bran by Ferulic Acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydrate Research*, 263, 257-269.

Ralet M-C., Thibault J-F., Faulds C.B., Williamson G. 1994. Isolation and Purification of feruloylated Oligosaccharides from Cell Walls of Sugar-Beet Pulp. *Carbohydrate Research*. 263, 227-241.

- Ralet M.C., Faulds C., Williamson G. Thibault J-F.** 1994 Feruloylated oligosaccharides from cell-wall polysaccharides III: degradation of feruloylated oligosaccharides from sugar beet pulp and wheat bran by ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*. *Carbohydrates Research*. **263**, 257-269.
- Rao R.S., Ravishankar G.A.** 2000. Vanilla Flavour: Production by Conventional and Biotechnological Routes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80**, 289-304.
- Rooney L.** 1998. Productos de Maíz Nixtamalizado y Calidad del Maíz. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 1-17.
- Rombouts F.M., Thibault J.** 1986. Enzymic and Chemical Degradation and the Fine Structure of Pectins From Sugar-Beet Pulp. **154**, 189-203.
- Rombouts F.M., Thibault J.** 1986. Feruloylated Pectic Substances from Sugar-Beet Pulp. *Carbohydrate Research*. **154**, 177-187.
- Rosazza J.N.P., Huang Z., Dostal L., Volm T., Rousseau B.,** 1995. Biocatalytic Transformations of Ferulic Acid: an Abundant Aromatic Natural Product. *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, 457-471.
- Ronald P., Vries, Visser J.** 1999. Regulation of ghe Feruloyl Esterase (fase A) Gene from *Aspergillus Niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 12, 5500-5503.
- Saha B.C:** 2000. β -L-Arabinofurnosidasas: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. *Biotechnology Advances*, **18**,403-423

- Skrzypek Z., Wysokinska H., Swiatek L., Wroblewski A.E.** 1999. Phenylpropanoid Glycosides from *Penstemon serrulatus*. *Journal of Natural Products*, **62**, 127-129.
- Sonaghy J., Kelly P.F. McKay A.M.** 1998. Detection of Ferulic Acid Esterase Production by *Bacillus* spp. and *Lactobacilli*. *Applied Microbiology Biotechnology*, **50**, 257-20.
- Temp U., Eggert C.** 1999. Novel Interaction Between Laccase and Cellobiose Dehydrogenase during Pigment Synthesis in the White Rot Fungus. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 2, 389-395.
- Turner J.A., Rice E.L.** 1975. Microbial Decomposition of Ferulic Acid in Soil. *Journal of Chemical Ecology*. **1**, 1, 41-58.
- Whitehead I.M.** 1998. Challenges to Biocatalysis from Flavor Chemistry. *Food Technology*, **52**, 2, 40-46.
- Wilez J., Jonhs J.** 1992 *Enciclopedia of Food. Science and Technology*. Edit. Y.H. Hui, 4, 2641-2656.

Curvas de calibración

Se realizaron dos curvas de calibración, una para el ácido ferúlico y otra para la vainillina, manejándose 5 y 7 concentraciones respectivamente.

En el caso del ácido ferúlico se utilizaron cinco concentraciones: 5,4,3,2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ y para la vainillina se utilizaron siete concentraciones: 5,4,3,2,1,0.5 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$. Cada una de las concentraciones se inyectó por triplicado.

Para tener las concentraciones manejadas como estándares, se pesaron 0.05 g de ácido ferúlico y de vainillina por separado. Cada uno de los reactivos se disolvió en agua destilada, desionizada y microfiltrada. Se aforaron a 100 ml cada una de las soluciones.

A partir de esta solución inicial se fueron tomando alícuotas para obtener las concentraciones reportadas. La preparación de las concentraciones fueron simultáneas a la inyección en el HPLC.

La siguiente tabla muestra las concentraciones que se inyectaron de cada reactivo para construir con posterioridad la curva patrón de cada compuesto:

Compuesto	Concentración (µg/ml)
Ácido ferúlico	5.0
Ácido ferúlico	4.0
Ácido ferúlico	3
Ácido ferúlico	2.0
Ácido ferúlico	1.0
Vainillina	5.0
Vainillina	4.0
Vainillina	3.0
Vainillina	2.0
Vainillina	1.0
Vainillina	0.5
Vainillina	0.25

Tabla 9. Concentración de los estándares.

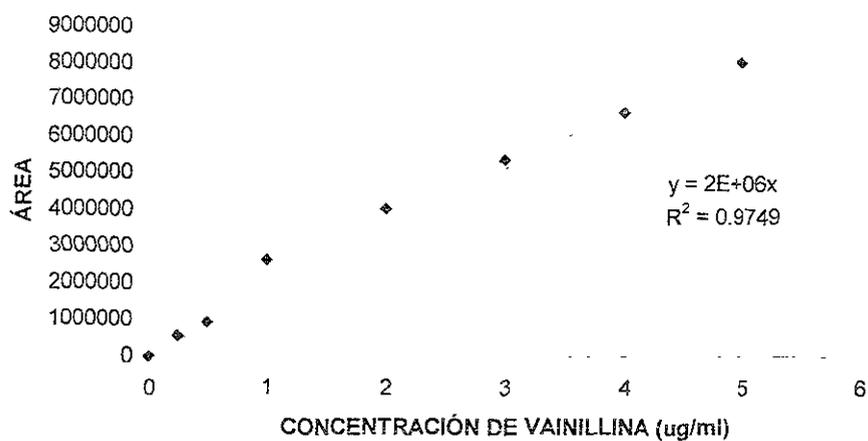


Figura 8. Curva de calibración de vainillina en una columna C-18 por el método de HPLC.

ESTA TESIS FUE CREADA
 DE LA BIBLIOTECA

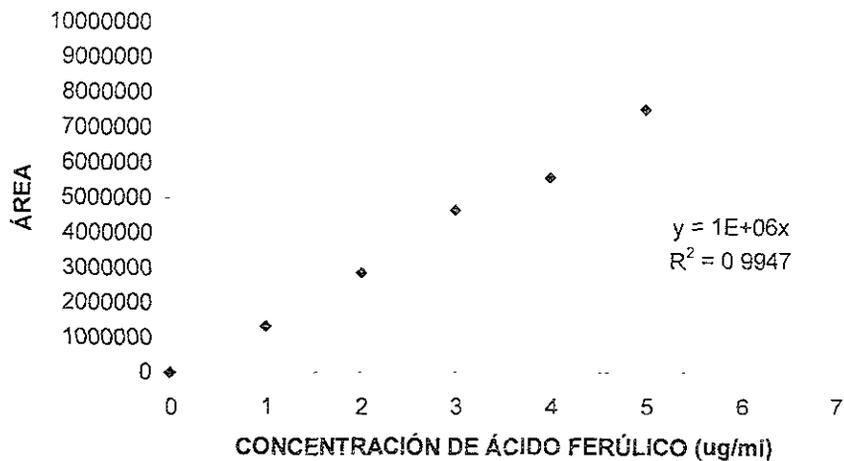


Figura 9. Curva de calibración del ácido ferúlico en una columna C-18 por el método de HPLC.