

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**DISEÑO DE UN SISTEMA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO
FERÚLICO PRESENTE EN EL PERICARPIO DE MAÍZ**

Por:

ROSALÍA SIMONA SANDOVAL GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación en Procesos Sustentables**

SEPTIEMBRE, 2009

DISEÑO DE UN SISTEMA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO FERÚLICO PRESENTE EN EL PERICARPIO DE MAÍZ

Aprobación de la Tesis:

Dra. Mónica Noel Sánchez González
Asesor de Tesis

-Nombre-
Evaluador de la Tesis

-Nombre-
Evaluador de la Tesis

Dra. Ma. Teresa Garza González
Sub-directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Rosalía Simona Sandoval González Fecha de Graduación:

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de Estudio: DISEÑO DE UN SISTEMA PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO FERÚLICO
PRESENTE EN EL PERICARPIO DE MAÍZ

Número de páginas: 55

Candidata para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Procesos
Sustentables

Área de Estudio: Procesos Sustentables

Propósito y Método del Estudio: El ácido ferúlico (AF) es un potente antioxidante natural presente en cereales, principalmente en el pericarpio de maíz. Se encuentra unido por enlaces éster a cadenas de arabinosilanos, los cuales son hidrolizados al ser expuestos a pH's extremos. Sin embargo, estos tratamientos químicos necesitan altas concentraciones de álcalis lo que ocasiona cambios químicos indeseados alrededor de la membrana celular de la planta además de que son contaminantes para el medio ambiente. Un método más específico y eficaz es la hidrólisis enzimática. Las feruloil esterasas son enzimas capaces de hidrolizar el enlace éster del AF en el pericarpio de maíz; sin embargo, existen escasas preparaciones comerciales. Se diseñó un sistema para la liberación del AF utilizando el microorganismo alcalófilo productor de feruloil esterasas, *Bacillus megaterium* MS2. Se evaluaron y seleccionaron los componentes importantes del medio de cultivo y se determinó la concentración óptima del mismo para la liberación de AF del pericarpio de maíz. Para determinar los factores que impactan la hidrólisis microbiana del AF se realizaron pruebas experimentales en un fermentador de 3L.

Conclusiones:

- *Bacillus megaterium* MS2 es una herramienta para la liberación de AF presente en el pericarpio de maíz, esta liberación de AF es afectada por los componentes del medio de cultivo. Los componentes importantes son el pericarpio de maíz como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno y carbonato de calcio como solución amortiguadora para el control de pH. El calcio, favorece la hidrólisis microbiana, debido a que es necesario para la expresión de enzimas alcalófilas.
- El crecimiento de *B. megaterium* MS2 no está ligado a la liberación de AF, debido a que la cantidad de AF liberada es mayor en la etapa de muerte del microorganismo.
- La composición óptima del medio de cultivo para la liberación de AF presente en el pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2 es 20g/L de pericarpio de maíz, 5g/L de extracto de levadura, 15g/L de carbonato de calcio. Alcanzando un rendimiento entre el 10-15% de AF liberado con respecto al AF liberado químicamente.
- En un reactor de 3L es posible aumentar la cantidad de AF liberado del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2 al controlar el pH en 10, aireando las primeras 24h de la fermentación, con una agitación de 210 rpm a 28°C. Se obtuvo un rendimiento del 50% de liberación de AF con respecto a la cantidad liberada por una hidrólisis química.

FIRMA DEL ASESOR: _____

DEDICATORIAS

A mi Señor Dios

Por darme la oportunidad tan maravillosa de vivir y de conocer su amor infinito pero sobre todo por permitirme terminar esta etapa de mi vida tan importante y valiosa.

A Mis Padres

María de la Luz González Flores y Sergio Manuel Sandoval Tinajero por su amor, apoyo, comprensión, consejos y sus múltiples e innumerables esfuerzos. Que Dios los bendiga.

A Mis Hermanos

Sarai y Sergio por su paciencia, motivación y preocupación que me brindaron en cada momento.

A mi mejor amigo

Ricardo por su apoyo, consejos, fortaleza y compañía que me brindó en todo momento.

Mil gracias

AGRADECIMIENTOS

PAICyT proyecto CN1547-07 y al proyecto **SEP-CONACyT** 83263

Agradecimientos a **CIASA** por las muestras proporcionadas y las facilidades otorgadas

AGRADECIMIENTOS

Dra. Mónica Noel Sánchez González y Dr. Felipe de Jesús Cerino Córdova. Por haberme dado la oportunidad de trabajar con ustedes, por su paciencia, apoyo, consejos, confianza y por permitirme aprender de la experiencia de cada uno de ustedes.

Dr. José Enrique Botello Álvarez y Dr. José Luis Navarrete Bolaños por el apoyo prestado para la realización de este proyecto.

QFB. Carlos Castillo Zacarías por permitirme trabajar en el Laboratorio de Biotecnología y las facilidades prestadas en todo momento.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Biotecnología y Biofarmacia: Carlos, Pedro, Allan, Magda, Esther, Emmanuel, Sandra, Claudia, Ángel, Rocío, Karol, Julián y Natalie por el apoyo que de una u otra forma recibí de ustedes y por su agradable compañía.

A mis amigos del Laboratorio de Bioingeniería del Instituto Tecnológico de Celaya: Mayra, Marcelú, Marce, Erika, Giselle, Javier, Luis y Erick por apoyo, compañía y por hacerme sentir como en casa.

GRACIAS

TABLA DE CONTENIDO

| Capítulo | Página |
|--|-----------|
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Ácido Ferúlico | 1 |
| 1.2 Importancia comercial del AF | 2 |
| 1.3 Industria de la tortilla | 3 |
| 1.3.1 Nixtamalización | 4 |
| 1.4 Justificación | 4 |
| 2. ANTECEDENTES | 6 |
| 2.1 Hidrólisis del Pericarpio de Maíz | 6 |
| 2.1.1 Hidrólisis química | 6 |
| 2.1.2 Hidrólisis enzimática | 7 |
| 2.2 Microorganismos utilizados en la liberación de AF a partir de residuos agroindustriales | 8 |
| 2.3 <i>Bacillus megaterium</i> MS2 | 10 |
| 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL PROYECTO | 12 |
| 3.1 Hipótesis | 12 |
| 3.2 Objetivo General | 12 |
| 3.3 Objetivos Específicos | 13 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 4.1 Materiales y equipos | 14 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Técnicas analíticas para determinar la concentración de AF y crecimiento | 15 |
| 4.2.1 Preparación de las muestras..... | 15 |
| 4.2.2 Cuantificación de fenoles totales..... | 15 |
| 4.2.3 Método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) | 16 |
| 4.2.4 Cuantificación del crecimiento microbiano..... | 16 |
| 4.3 Disposición de Residuos..... | 17 |
| 4.4 Metodología Experimental | 17 |
| 4.4.1 Tratamiento del pericarpio de maíz | 17 |
| 4.4.2 Almacenamiento del <i>Bacillus megaterium</i> MS2..... | 17 |
| 4.4.3 Hidrólisis química del pericarpio de maíz..... | 17 |
| 4.4.4 Selección de álcalis como componentes del medio de cultivo | 18 |
| 4.4.5 Efecto de los álcalis en la liberación de AF por <i>B. megaterium</i> MS2 | 18 |
| 4.4.6 Influencia de la dextrosa en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 19 |
| 4.4.7 Influencia de un medio mineral en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2..... | 19 |
| 4.4.8 Efecto de la temperatura en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2..... | 19 |
| 4.4.9 Diseño de experimentos para la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2..... | 20 |
| 4.4.10 Pruebas experimentales en reactor de 3L..... | 20 |
| 4.4.10.1 Influencia de AF libre en la hidrólisis microbiana del pericarpio de maíz..... | 21 |
| 4.4.10.2 Efecto de la aireación sobre la | |

| | |
|---|-----------|
| liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 22 |
| 4.4.10.3 Efecto del control de pH en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 22 |
| 4.4.10.4 Efecto de la velocidad de agitación en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 22 |
| 5. RESULTADOS | 24 |
| 5.1 Selección de álcalis como componentes del medio de cultivo | 24 |
| 5.2 Efecto de los álcalis en la liberación de AF por <i>B. megaterium</i> MS2..... | 25 |
| 5.3 Modificación de los componentes del medio de cultivo IP | 26 |
| 5.3.1 Influencia de la dextrosa en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 26 |
| 5.3.2 Influencia de un medio mineral en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2..... | 28 |
| 5.4 Efecto de la temperatura en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 29 |
| 5.5 Diseño de experimentos para la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 30 |
| 5.6 Pruebas experimentales en reactor de 3 L | 32 |
| 5.6.1 Influencia de AF libre en la hidrólisis microbiana del pericarpio de maíz | 32 |
| 5.6.2 Efecto de la aireación sobre la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 34 |
| 5.6.3 Efecto del control de pH en la liberación de AF | |

| | |
|--|-----------|
| del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 36 |
| 5.6.4 Efecto de la velocidad de agitación en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 38 |
| 5.7 Rendimiento en la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 40 |
| 5.8 Diagrama del sistema para la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2 | 41 |
| 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS..... | 43 |
| 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 46 |
| BIBLIOGRAFÍA | 48 |
| APÉNDICES | 52 |
| APÉNDICE A.- CURVA ESTÁNDAR UTILIZADA PARA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES | 53 |
| APÉNDICE B.- CURVA ESTÁNDAR UTILIZADA PARA EL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)..... | 55 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| I. | Proporciones del gradiente de solventes (CLAR) utilizado para el análisis del AF..... | 16 |
| II. | Diseño factorial 2^3 para la liberación de AF..... | 20 |
| III. | Experimentos de la liberación del AF..... | 29 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|---------------|
| 1. Formula estructural del ácido ferúlico..... | 1 |
| 2. Reacción catalizada por la feruloil esterasa..... | 7 |
| 3. Reactor de 3 L marca Applikon®..... | 21 |
| 4. Selección de álcalis como componentes del medio de cultivo. | 23 |
| 5. Efecto de la presencia de bicarbonato de sodio y carbonato de calcio en la liberación de AF por <i>B. megaterium</i> MS2..... | 24 |
| 6. Crecimiento de <i>B. megaterium</i> MS2 en presencia de bicarbonato de sodio y carbonato de calcio como componentes del medio de cultivo..... | 25 |
| 7. Influencia de la dextrosa en la liberación de AF..... | 26 |
| 8. Influencia de la dextrosa en el crecimiento de <i>B. megaterium</i> MS2..... | 26 |
| 9. Influencia de un medio mineral en la hidrólisis de AF..... | 27 |
| 10. Efecto de la temperatura en la liberación de AF..... | 28 |
| 11. Efecto de la temperatura en el crecimiento de <i>B. megaterium</i> MS2..... | 28 |
| 12. Gráfica de probabilidad normal de los efectos de la liberación de AF..... | 30 |
| 13. Gráfica de cubo de la liberación de AF..... | 31 |
| 14. Efecto de la eliminación de AF libre..... | 32 |
| 15. Efecto de la eliminación de AF libre en el pH del medio de cultivo..... | 33 |
| 16. Efecto de la aireación sobre la liberación de AF..... | 34 |
| 17. Efecto de la aireación en el crecimiento de <i>B. megaterium</i> MS2..... | 34 |
| 18. Efecto de la aireación sobre el pH del medio de cultivo..... | 35 |
| 19. Efecto del control de pH sobre la liberación de AF del | |

| | |
|--|----|
| pericarpio de maíz y crecimiento de <i>B. megaterium</i> MS2..... | 36 |
| 20. Efecto del control de pH sobre el pH del medio de cultivo..... | 37 |
| 21. Efecto de la velocidad de agitación en la liberación de AF del pericarpio de maíz y en el crecimiento de <i>B. megaterium</i> MS2.. | 38 |
| 22. Rendimiento de la liberación de AF del pericarpio de maíz por <i>B. megaterium</i> MS2..... | 39 |
| 23. Diagrama del bioproceso para la liberación de AF del pericarpio de maíz..... | 41 |
| 24. Curva estándar para la cuantificación de fenoles totales..... | 53 |
| 25. Curva estándar de AF para el CLAR Waters 2695..... | 55 |

NOMENCLATURA

| | |
|------------------|---|
| AF | Ácido ferúlico |
| LD ₅₀ | Dosis letal media |
| g | Gramos |
| kg | Kilogramos |
| UV | ultravioleta |
| FDA | Administración de alimentos y fármacos |
| p/v | Peso/volumen |
| PM | Pericarpio de maíz |
| gAF | Gramos de ácido ferúlico |
| kgPM | Kilogramos de pericarpio de maíz |
| FAE | Acido ferúlico esterasas |
| mU | Miliunidades |
| mg | Miligramos |
| Vis | Visible |
| CLAR | Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| N | Normalidad |
| ml | Mililitro |
| µL | Microlitros |
| M | Molar |
| seg | Segundos |
| L | Litros |
| min | Minutos |
| v/v/v | Volumen/ volumen/ volumen |
| nm | Nanómetros |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| IP | Iowa pericarpio |
| h | Horas |
| v/v | Volumen/volumen |
| lb | libras |
| SAGARPA | Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. |

IPO lowa pericarpio optimizado

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Ácido Ferúlico

El ácido ferúlico (4- hidroxí-3-metoxi ácido cinámico) (Figura 1), es un compuesto fenólico abundante en la naturaleza, perteneciente a la familia del ácido cinámico. El ácido ferúlico (AF) es una sustancia encontrada abundantemente en el pericarpio de cereales como el trigo, arroz, avena y maíz.¹

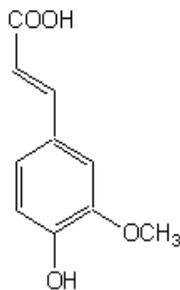


Figura 1. Formula estructural del ácido ferúlico

La cantidad de AF presente en los cereales varía extensamente dependiendo de la especie y de las condiciones de crecimiento.²

Una de las funciones principales del ácido ferúlico es proporcionar rigidez estructural y fuerza a la pared celular de los granos, debido a que se encuentra entrecruzando cadenas de pentosanos, arabinoxilanos y hemicelulosa haciendo estos compuestos menos susceptibles a la acción de enzimas hidrolíticas durante la germinación. Asimismo, le confiere protección a las plantas contra el ataque de aves, insectos, virus y hongos.¹

El ácido ferúlico es de baja toxicidad, LD₅₀ de 2445 mg/kg peso corporal en ratas³ y puede ser absorbido y fácilmente metabolizado en el cuerpo humano. Este compuesto es muy abundante en cereales como el maíz (1g/kg) y el trigo (0.5 g/kg).¹

1.2 Importancia comercial del AF

Producción de vainillina

El ácido ferúlico puede ser utilizado como un intermediario en la producción de vainillina y como medio de control para la decoloración de las frutas y los vegetales durante su procesamiento.⁴

La vainillina es un saborizante importante usado en alimentos, bebidas, perfumes y productos farmacéuticos. La vainilla de origen natural se obtiene de las vainas de la planta *Vainilla planifolia*, sin embargo, esta fuente es limitada ocasionando un alto precio del saborizante en el mercado, actualmente se produce a escala industrial mediante síntesis química.⁴ Debido a que la tendencia actual son los productos naturales, la biotransformación del ácido ferúlico es una de las alternativas que han sido estudiadas para la producción de vainillina.³

Antioxidante

Los radicales libres son moléculas químicamente reactivas producidas en células como subproductos de procesos bioquímicos normales, particularmente del metabolismo de azúcares y de las grasas. Una vez que se han producido, los radicales libres pueden dañar casi cualquier estructura biológica que esté en contacto con ellos. Las membranas de las células contienen muchos componentes que son propensos al

daño del radical libre. Nosotros percibimos los resultados del daño como el envejecimiento.²

El AF es un antioxidante, neutraliza los radicales libres conocidos como superóxido, radical hidroxilo y óxido nítrico. Actúa en sinergismo con otros antioxidantes dándoles potencia adicional. El AF puede incrementar su actividad por la exposición a la luz UV, sugiriendo que puede ayudar a proteger la piel contra el daño del sol.²

En Japón se ha aprobado el uso del ácido ferúlico como antioxidante natural en alimentos, bebidas y cosméticos. En Estados Unidos de América y la gran mayoría de países europeos, numerosos extractos naturales y esencias medicinales de hierbas, café, vainilla, especias y otras sustancias botánicas, son seleccionados por su alto contenido de ácido ferúlico para ser añadidos a los alimentos como antioxidantes (aprobados por FDA).³ Debido al poder antioxidante del AF, actualmente las investigaciones se orientan hacia el diseño de tratamientos para su extracción de fuentes naturales.

Terapéutico

Diversos estudios en la literatura sugieren el uso del ácido ferúlico como terapéutico pues es auxiliar en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, entre otras. Sin embargo, muchas de estas propiedades están actualmente en estudio.⁵

1.3 Industria de la tortilla

El maíz es el cereal con mayor contenido de ácido ferúlico; sin embargo, a nivel mundial el 70% de la producción de este grano se destina a la ganadería. A diferencia del resto de los principales países productores y consumidores de maíz, en México y Centroamérica el uso del cereal es predominantemente para consumo humano. A nivel Nacional ocupa el primer lugar entre los cultivos básicos seguido del frijol y el sorgo.⁶ La SAGARPA ha registrado que la producción de los principales cultivos agrícolas en México, fue de 106.9 millones de toneladas, al término del primer semestre

del 2009, destacando la siembra del maíz que participa con el 80% del total de este rubro.⁷

Desde tiempos prehispánicos la tortilla ha sido parte fundamental de la dieta de los mexicanos. En México, se producen alrededor de 3.0 millones de toneladas de harina nixtamalizada al año.⁸

1.3.1 Nixtamalización

Las tortillas son producidas a partir de masa o de harina de maíz, mediante el proceso de nixtamalización (palabra del náhuatl, derivada de *nextil* que significa cenizas o cenizas de cal y *tamalli*, masa de maíz). En su forma tradicional, este proceso consiste en hervir el maíz en agua en presencia de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 1-3% (p/v) durante 20 a 40 minutos. Al finalizar esta etapa el líquido de cocción, llamado nejayote, se elimina. El maíz nixtamalizado se lava con agua para eliminar el exceso de cal y se muele para obtener una masa que sirve para preparar un gran número de alimentos entre los que destaca notablemente la tortilla.⁹

Durante la nixtamalización se gelatiniza el almidón, se hidroliza una porción de la hemicelulosa del pericarpio, por lo que se desprende del grano y es obtenido en el nejayote como subproducto del proceso.⁹

1.4 Justificación

Del proceso de nixtamalización se obtienen dos diferentes corrientes: el nixtamal y el nejayote. El nejayote contiene de 1-3% (p/v) de sólidos, entre los que se encuentran el pericarpio y el endospermo. Tanto el pericarpio del maíz como el nejayote, son fuentes importantes de AF. El contenido de AF reportado para el pericarpio de maíz crudo es 11.13 g/kg.¹⁰ Por lo que respecta al nejayote, la cantidad de AF es variable dependiendo del proceso y tiempo de almacenamiento debido a que microorganismos presentes en este líquido alcalino transforman al AF disminuyendo su concentración.

Por lo anterior la fuente más constante de ácido ferúlico es el pericarpio de maíz. Actualmente la compañía de MASECA ha reportado que en la planta de Ruiz Cortinez en Monterrey, N. L. se producen en promedio 170 toneladas de harina nixtamalizada por día, de esta producción se desechan 5.1 toneladas de pericarpio de maíz.

Actualmente el pericarpio de maíz es usado como alimento para ganado a pesar de su alto contenido de ácido ferúlico (16gAF/kgPM) y pocos esfuerzos han sido dirigidos a la utilización del pericarpio de maíz nixtamalizado como fuente para la obtención de ácido ferúlico y los reportados utilizan tratamientos químicos. Estos tratamientos químicos utilizan altas concentraciones de base que son contaminantes para el medio ambiente.¹¹

En estudios realizados anteriormente se logró aislar microorganismos del nejayote, que al crecer en presencia de pericarpio de maíz tienen la capacidad de liberar el ácido ferúlico unido a éste. Por lo cual existe un interés en diseñar un sistema para la liberación de AF del pericarpio de maíz por microorganismos nativos del nejayote.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Hidrólisis del Pericarpio de Maíz

El AF se encuentra ligado en forma covalente a los polisacáridos por enlaces éster y a los componentes de la lignina por enlaces de éter o éster. En el pericarpio del maíz, el ácido ferúlico se encuentra en tres fracciones distintas: una fracción celulósica, una fracción hemicelulósica y una fracción no-carbohidratada. La fracción no-carbohidratada se caracteriza por ser un extracto obtenido por medio de solventes orgánicos, que contiene por encima del 10% del ácido ferúlico total presente en el pericarpio del maíz.¹²

2.1.1 Hidrólisis química

La liberación de la fracción hemicelulósica y celulósica del pericarpio a una fase acuosa se realiza a través de procesos químicos. La membrana celular de la planta^{13, 14} se expone a pHs extremos para romper ciertas uniones dentro la pared celular. La hidrólisis alcalina rompe el enlace éster que liga los ácidos fenólicos a la pared celular. Por otra parte el tratamiento ácido rompe enlaces glucosídicos y solubiliza los azúcares, pero deja los enlaces éster generalmente intactos. A pesar de que este método presenta altos rendimientos en la liberación de AF, estos tratamientos químicos requieren de altas concentraciones de ácido o base, ocasionan modificaciones en otros componentes y traen a menudo cambios químicos indeseados alrededor de la membrana celular de la planta.^{10,13}

2.1.2 Hidrólisis enzimática

Un método más específico y eficaz que puede sustituir a la hidrólisis química, es la hidrólisis enzimática. Dentro de las enzimas que pudieran ser utilizadas se encuentran las feruloil esterasas, las cuales son una subclase de las esterasas provenientes del ácido carboxílico, son capaces de hidrolizar el enlace éster de los ácidos hidroxicinámicos y azúcares presentes en las membranas celulares de las plantas (Figura 2).¹³

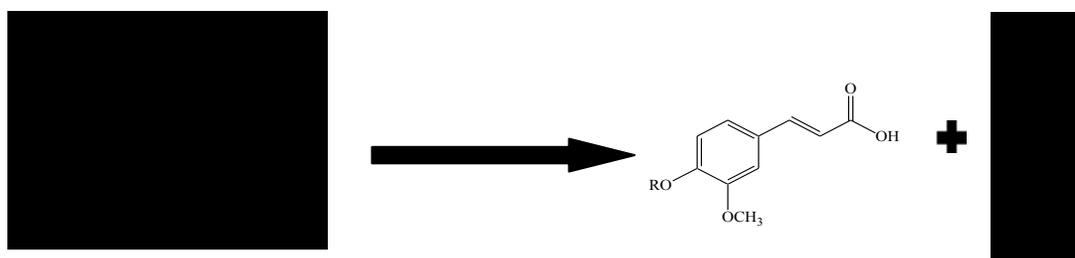


Figura 2. Reacción catalizada por la feruloil esterasa

A través de las feruloil esterasas es posible obtener el AF a partir de residuos agroindustriales. Sin embargo, son escasas las preparaciones enzimáticas que han sido comercializadas y por otra parte, existen enzimas, como las xilanasas, que actúan sinérgicamente con las feruloil esterasas facilitando su trabajo, por lo tanto, una opción sería la utilización de microorganismos que sean productores de estas enzimas. En trabajos de investigación se han aislado del nejayote microorganismos que producen dichas enzimas. En este trabajo se analizará su eficiencia para la recuperación del AF.

2.2 Microorganismos utilizados en la liberación de AF a partir de residuos agroindustriales

Las feruloil esterasas han sido aisladas de un gran número de microorganismos, cuando éstos crecen en sustratos complejos como el xilano^{13, 15}, pectina^{13, 15}, salvado de trigo^{13, 15}, cebada⁵, pulpa de remolacha^{13, 15} o bagazo de caña de azúcar.¹⁶ Estas enzimas han sido purificadas y caracterizadas en *Streptomyces olivochromogenes*^{13, 15}, *Pseudomonas fluorescens*^{13, 15, 16}, *Neocallimastix MC-29*¹⁵, *Penicillium pinophilum*¹³, *Schizophyllum commune*¹³, *Clostridium thermocellum*¹³, *Talaromyces stipitatus*¹³, *Fusarium oxysporum*^{15, 17}, *Piromyces equi*^{15, 17}, *Sporotrichum thermophile*¹⁵, *Neurospora crassa*¹⁵, *Penicillium expansum*¹⁵, *Trichoderma viride*⁵, *Streptomyces avermitilis* UAH30¹⁶ y de varias especies de *Aspergillus*.^{5, 13, 15, 17}

Hyun-Dong Shin *et al*¹⁸ produjeron y caracterizaron feruloil esterasas del *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. Utilizaron un medio de cultivo mineral con tartrato de amonio como fuente de nitrógeno y salvado de maíz como fuente de carbono. Encontraron que las fuentes de nitrógeno y carbono en el medio de cultivo influyen fuertemente en la producción de la enzima debido a que, este microorganismo, requiere de sales inorgánicas de nitrógeno para la producción de feruloil esterasas y que fuentes orgánicas complejas de nitrógeno como el extracto de levadura y la peptona suprimen severamente la producción de feruloil esterasas. Monosacáridos como la glucosa y xilosa no influyen en la producción de feruloil esterasas, fuentes de carbono complejas son requeridas para la producción de feruloil esterasas por *F. proliferatum* NRRL 26517. La presencia de ácido ferúlico libre no estimula la producción de feruloil esterasas debido a que es necesario la presencia de ésteres de AF para la inducción de la producción de esta enzima por *F. proliferatum*.

B. L. García *et al*¹⁹ produjeron y caracterizaron ácido ferúlico esterasas (FAE) de *Streptomyces avermitilis* CECT 3339. Encontraron que este microorganismo presenta actividad de FAE extracelulares al crecer con sustratos de lignocelulosa, probaron glucosa, salvado de trigo y arabinosilano como fuentes de carbono y extracto de levadura, peptona, urea y sulfato de amonio como fuentes de nitrógeno. Reportaron una actividad máxima de FAE (16.8mU mg proteína⁻¹) en el medio de cultivo compuesto por extracto de levadura como fuente de nitrógeno y salvado de trigo como fuente de carbono. No encontraron actividad de FAE al utilizar glucosa como fuente de carbono independientemente de la fuente de nitrógeno utilizada. Analizaron el efecto sobre la actividad de FAE al adicionar ácido ferúlico en el medio de cultivo y encontraron, que la adición de éste, inhibe un 90% la actividad de FAE. Una temperatura de 50°C y pH 6 fueron óptimos para la actividad de FAE del *S. avermitilis* CECT 3339, no se reportó rendimiento sobre AF liberado.

Evangelos Topakas y Paul Christakopoulos²⁰ produjeron y caracterizaron parcialmente feruloil esterasas alcalinas de *Fusarium oxysporum*. Analizaron el efecto del pH inicial del medio de cultivo sobre la producción de feruloil esterasas, en el rango de 5-9 usando mazorcas de maíz y fosfato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, encontrando mayor actividad de las feruloil esterasas en el pH inicial de 8. Probaron diferentes fuentes de carbono como glucosa, xilosa, lactosa, mazorca de maíz, salvado de maíz, salvado de trigo, paja de trigo y pulpa de betabel; utilizando fosfato de amonio como fuente de nitrógeno y reportaron mayor actividad de feruloil esterasas al utilizar mazorca de maíz como fuente de carbono. También probaron diferentes fuentes de nitrógeno como fosfato de amonio, sulfato de amonio, nitrato de sodio, urea, peptona y extracto de levadura utilizando mazorca de maíz como fuente de carbono; encontraron mejor actividad de feruloil esterasas en las fuentes inorgánicas de nitrógeno, con fosfato de amonio como fuente de nitrógeno obteniendo mayor actividad. En esta investigación probaron el efecto del ácido ferúlico libre en el medio de cultivo obteniendo que la presencia de éste inhibe considerablemente la actividad de feruloil esterasas de *Fusarium oxysporum*, en ninguno de los componentes analizados reportaron rendimiento de la liberación de AF.

En los últimos años el número de feruloil esterasas microbianas identificadas ha aumentado hasta 30 con 10 genes secuenciados. Algunas de las esterasas son parte de un complejo modular enlazadas a módulos de celulasa o existen solamente como dominio catalítico¹³.

2.3 *Bacillus megaterium* MS2

Se ha reportado en la literatura cepas de *Bacillus megaterium* cuyo pH óptimo de crecimiento se ubica por arriba de la neutralidad. Los microorganismos alcalófilos tienen la cualidad de producir enzimas extracelulares con capacidad de ser activas a pH alcalinos, lo cual proporciona versatilidad a las transformaciones biocatalíticas.²¹

Considerando estos factores, y los resultados obtenidos por M Sánchez²² se aislaron 6 cepas de *Bacillus megaterium* del nejayote derivado de un proceso industrial. Para el aislamiento de estos microorganismos, se hicieron crecer en medios sólidos a base de nejayote (pH 11). Los microorganismos fueron identificados a través de la secuencia del 16S rADN presentando un 99% de identidad con *Bacillus megaterium*.²²

Los microorganismos fueron caracterizados bioquímicamente presentando diferencias en la velocidad de crecimiento, consumo de citratos y producción de enzimas. Respecto a este último punto, se detectó la producción de feruloil esterasas en las seis cepas; sin embargo, las cepas MS2 y MS4 las sintetizaban en mayor cantidad. Las cepas MS2 y MS4 de *Bacillus megaterium* fueron además capaces de liberar AF al crecer en presencia de pericarpio de maíz. Se detectó que estos microorganismos son productores de xilanasas y amilasas, que al hidrolizar polímeros de xilosa y almidón presentes en harinas de pericarpio industrial, facilitan el trabajo de las feruloil esterasas. La habilidad para crecer en medios alcalinos de estas bacterias, pudiera presentar ventajas al facilitar la hidrólisis del enlace por cambios en la configuración de la molécula. Por lo tanto, estos microorganismos son identificados como herramientas importantes para la liberación de AF a partir de pericarpio de maíz.

De acuerdo a la literatura analizada ningún microorganismo ha sido empleado en la recuperación del ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz nixtamalizado, además, ninguna cepa del género *Bacillus* ha sido utilizada en la recuperación de ácido ferúlico. Por lo tanto las cepas MS2 de *Bacillus megaterium* aisladas del nejayote serán los primeros microorganismos utilizados para este fin.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVO DEL PROYECTO

3.1 Hipótesis

El ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz es hidrolizado utilizando un sistema que involucra una cepa de *Bacillus megaterium* MS2

3.2 Objetivo General

Diseñar un sistema para hidrolizar el ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz por la acción de *Bacillus megaterium* MS2

3.3 Objetivos Específicos

- Determinar los componentes importantes del medio de cultivo para la hidrólisis del ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz.
- Encontrar la concentración óptima de los componentes del medio de cultivo para la hidrólisis del ácido ferúlico a través de un diseño de experimentos.
- Determinar las variables que influyen en la hidrólisis microbiana del pericarpio de maíz en un reactor de 3L.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y equipos

Se presentan los reactivos utilizados durante el estudio: dextrosa anhidra (CTR Scientific), harina de maíz, hidróxido de calcio (CTR Scientific), extracto de levadura (Difco™), agar bacteriológico (Bioxon), bicarbonato de sodio (Productos Químicos Monterrey S.A.), carbonato de calcio (J.T. Baker), sulfato de amonio (Productos Químicos Monterrey S.A.), fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker) fosfato de potasio dibásico (Productos Químicos Monterrey), sulfato de magnesio heptahidratado (CTR Scientific), cloruro de calcio (J.T. Baker), hidróxido de sodio (Fermont), carbonato de sodio (CTR Scientific), alcohol etílico (DEQ), ácido acético glacial (Fisher Scientific), ácido ferúlico (SAFC), folin-ciocalteu's phenol reagent 2N (Sigma), ácido clorhídrico (Fermont), acetato de etilo (CTR Scientific), pericarpio de maíz (donado por CIASA sucursal Ruiz Cortinez, Monterrey), ácido fórmico (Chemika Reagents), acetonitrilo grado HPLC (Fisher Scientific), metanol grado HPLC (Fisher Scientific), agua grado HPLC (Tedia Company Inc.), *Bacillus megaterium* MS2.

Los equipos que se utilizó para los análisis realizados fueron: espectrofotómetro UV/Vis (Spectronic® Genesys™5), rotavapor (Büchi), Cromatógrafo (Waters 2695), reactor 3L Bioconsole ADI1035 (Applikon® Dependable Instruments), Bio controller ADI1030 (Applikon® Dependable Instruments), microcentrifuga (Hettich Zentrifugen), autoclave (All american), campana de flujo laminar (Novatech), balanza analítica (AND), molino de café Aromatic (Braun), incubadora con agitación (Shel Lab).

4.2 Técnicas analíticas para determinar la concentración de AF y crecimiento

4.2.1 Preparación de las muestras

Se determinó la concentración de AF en las muestras a través de la cuantificación de fenoles totales o por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Para lo cual fue necesario acidificar las muestras con HCl 6N hasta alcanzar un pH entre 1 y 2. Posteriormente fueron extraídas con 3 volúmenes de acetato de etilo. Finalmente el acetato de etilo fue evaporado al vacío utilizando un rotavapor (Buchii). Las muestras se resuspendieron en 1ml de metanol para su análisis.

Cromatografía de líquidos de alta resolución. Para la cuantificación de la concentración de AF por CLAR, las muestras, después de resuspender en metanol, fueron filtradas utilizando membranas de 0.22 micras (Millipore) para eliminar partículas extrañas que pudieran dañar el Cromatógrafo Waters 2695.

4.2.2 Cuantificación de fenoles totales

La concentración de fenoles totales presentes en el cultivo de *B. megaterium* MS2 fue cuantificada a través del método Folin Ciocalteu.

A 20 μ L de muestra, se le añadieron 1500 μ L de agua destilada y 100 μ L del reactivo Folin Ciocalteu dejando reaccionar la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente. Terminando el tiempo de incubación se añadieron 300 μ L de una solución de carbonato de sodio 1.9M. Esta mezcla se dejó reaccionar por 15min a temperatura ambiente. Finalmente las reacciones fueron leídas en un espectrofotómetro (Spectronic® GenesysTM5) a una longitud de onda de 765nm. Un blanco fue preparado sustituyendo la muestra por 20 μ L de agua destilada. Debido a que el color de las muestras depende de los tiempos de incubación es importante dejar pasar 30 s antes de la adición de cada uno de los reactivos y de la lectura en el

espectro de cada tubo, con el fin de que los tiempos de incubación sean exactamente los mismos.

Para determinar la concentración de AF a través de los datos de absorbancia de las muestras, se preparó una curva estándar utilizando soluciones de AF en un intervalo de concentración de 0.01 a 1g/L. (Apéndice A).

La preparación del Na_2CO_3 utilizado en esta técnica, consistió en suspender 50g de Na_2CO_3 anhidro en 200ml de agua destilada y hervir hasta disolver el reactivo. La solución se deja enfriar a temperatura ambiente antes de aforar a 250ml.

4.2.3 Método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La concentración de ácido ferúlico fue medida mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), utilizando un Cromatógrafo Waters 2695. Como fase móvil se utilizó un gradiente de dos fases A y B a 0.80 ml/min. La fase móvil A, compuesta por agua:acetonitrilo:ácido fórmico en proporción 95:5:1 (v/v/v); la B, por acetonitrilo:agua:ácido fórmico en proporción 90:10:1 (v/v/v). Las proporciones de las fases durante el gradiente utilizado para la cuantificación del ácido ferúlico se presentan en la Tabla I. Las absorbancias fueron registradas a una longitud de onda de 282nm.²³

TABLA I

Proporciones del gradiente de solventes (CLAR) utilizado para el análisis del AF

| Tiempo (min.) | % A | % B |
|---------------|-----|-----|
| Inicial | 100 | 0 |
| 15.0 | 90 | 10 |
| 20.0 | 80 | 20 |
| 30.0 | 70 | 30 |

4.2.4 Cuantificación del crecimiento microbiano

El crecimiento de microorganismos se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 650nm en un espectrofotómetro (Spectronic® GenesysTM5). Los matraces de cultivo o las muestras del fermentador se dejaron reposar durante

3min para sedimentar las partículas de mayor peso, como el pericarpio de maíz. Posteriormente se tomaban 0.5ml del caldo con células para su lectura.

4.3 Disposición de Residuos

Los residuos generados durante el desarrollo de este proyecto fueron dispuestos en contenedores específicos de acuerdo a lo establecido por el Departamento de Residuos Peligrosos.

4.4 Metodología Experimental

4.4.1 Tratamiento del pericarpio de maíz

El pericarpio de maíz fue tamizado, para eliminar residuos salinos provenientes del proceso de nixtamalización. Posteriormente fue molido para disminuir el tamaño de partícula y facilitar su manejo.

4.4.2 Almacenamiento del *Bacillus megaterium* MS2

Bacillus megaterium MS2 fue conservado en el medio IOWA modificado el cual está compuesto por 20g/L dextrosa anhidra, 5g/L harina de maíz, 5g/L extracto de levadura, 8g/L $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y 15g/L de agar bacteriológico. El microorganismo fue cultivado en cajas petri a 37°C y almacenado a 4°C hasta su uso.

4.4.3 Hidrólisis química del pericarpio de maíz

Esta prueba se realizó para conocer la cantidad de AF que se puede extraer químicamente. Se colocaron 0.5g de pericarpio en un tubo cónico (Falcón) de 50ml, se agregaron 1.5ml de amilasa diluida 1:1000 y se incubó la mezcla en baño de agua a 65°C por 30 min. Posteriormente, se le agregaron 3.5 ml de NaOH 4.3M, se mezcló e incubó a 28°C y 175 rpm durante 1 hora. Terminada la incubación, fueron analizados por CLAR (sección 4.2.3) ²⁴

4.4.4 Selección de álcalis como componentes del medio de cultivo

Para la liberación de AF, *B. megaterium* MS2 fue crecido en el Medio Iowa Pericarpio (IP) compuesto por 5g/L de dextrosa, 5g/L de extracto de levadura, 5g/L de pericarpio de maíz y 8g/L de álcali. Debido a que el AF es hidrolizado bajo condiciones alcalinas primero se determinó la liberación de AF en medios de cultivo adicionados con tres bases diferentes $\text{Ca}(\text{OH})_2$, NaHCO_3 y CaCO_3 , sin microorganismo.

Los medios fueron preparados sin álcali. Este último fue solubilizado en una quinta parte del volumen total del medio de cultivo y esterilizado por separado. Posterior a la esterilización se agregó al medio de cultivo bajo condiciones de asepsia.

Para determinar el efecto del álcali sobre el pericarpio de maíz, los medios sin microorganismo, fueron incubados a 37°C y 150 rpm por 10 h y monitoreados al tomar muestra de 2 ml cada 2 h. El experimento se realizó por triplicado. Las muestras fueron analizadas por CLAR (sección 4.2.3)

4.4.5 Efecto de los álcalis en la liberación de AF por *B. megaterium* MS2

Después de seleccionar los álcalis que controlaran el pH y minimizaran la hidrólisis química del pericarpio de maíz, se determinó el efecto de éstos sobre la hidrólisis microbiana del pericarpio de maíz.

Se realizó por triplicado un cultivo en dos etapas. En la etapa I, 50ml de medio IP contenido en un matraz de 250ml, fue inoculado con una asada de *B. megaterium* MS2. Después de 24h de incubación a 37°C y 150 rpm, un inóculo del 5% se transfirió a un matraz que contenía medio IP nuevo para iniciar la etapa II. Los matraces se incubaron a 37°C y 150 rpm por 72 h, tomando muestras cada 24 h para ser analizadas por CLAR.

4.4.6 Influencia de la dextrosa en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Para determinar el efecto de la dextrosa sobre la hidrólisis microbiana de los ésteres de AF, se utilizó el medio IP con CaCO_3 como álcali (sección 4.3.4). Los inóculos se hicieron crecer en medio con o sin glucosa dependiendo de la prueba correspondiente, por triplicado. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C y 150 rpm por 72h. Las muestras fueron tomadas cada 24 h y se analizaron por CLAR.

4.4.7 Influencia de un medio mineral en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Para determinar el efecto de un medio mineral, se utilizó el medio reportado por Hyun-Dong Shin¹⁷ modificado. A este medio, compuesto por 1%(p/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.4% (p/v) de KH_2PO_4 , 1.4% (p/v) de K_2HPO_4 , 1.0% (p/v) de Na_2CO_3 , 0.02% (p/v) de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% (p/v) de CaCl_2 , se le adicionó 2% (p/v) de pericarpio de maíz como fuente de carbono y se ajustó el pH a 10 con NaOH 1N.

Los inóculos fueron preparados en este medio mineral y después de 24h de crecimiento una alícuota equivalente al 5% (v/v) fue transferida a otro matraz de medio mineral para iniciar la etapa II. Los cultivos se incubaron a 150rpm, pH 10 y 37°C durante 72h, esto se realizó por triplicado. Las muestras fueron tomadas cada 24h y se analizó la concentración de fenoles totales y pH.

4.4.8 Efecto de la temperatura en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Se evaluó el efecto de la temperatura sobre la liberación de AF por *B. megaterium* MS2. Para lo cual el microorganismo se hizo crecer en el medio IP con CaCO_3 y sin dextrosa a 37°C y 28°C por triplicado. Los cultivos se monitorearon por 72 h tomando muestras cada 24 h, para cuantificar crecimiento, pH y concentración de fenoles totales.

4.4.9 Diseño de experimentos para la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Después de seleccionar los componentes importantes del medio de cultivo para la liberación de AF del pericarpio de maíz, un diseño de experimentos fue realizado con el fin de determinar la concentración óptima de los mismos.

Se propuso un diseño factorial 2^3 , tres componentes a dos niveles de concentración. Los niveles para los componentes se muestran en la Tabla II.

TABLA II
Diseño factorial 2^3 para la liberación de AF

| Factores | Niveles | |
|----------------------------|---------|----|
| | -1 | 1 |
| Pericarpio de maíz (g/L) | 20 | 30 |
| Extracto de levadura (g/L) | 5 | 10 |
| CaCO ₃ (g/L) | 10 | 15 |

Los experimentos de este diseño se realizaron a 150rpm de agitación, pH 10, 28°C por 72 h, todo el diseño se realizó por triplicado, las muestras fueron tomadas cada 24 h analizando la concentración de fenoles totales, crecimiento y pH.

4.4.10 Pruebas experimentales en reactor de 3L

Se determinó el efecto de la aireación, agitación y control de pH en un reactor de 3 L. En estos estudios se utilizó un medio de cultivo IP optimizado (IPO), compuesto por 20 g/L de pericarpio de maíz, 15 g/L de CaCO₃ y 5 g/L de extracto de levadura.

Se utilizó un reactor de tanque agitado de 3 L marca Applikon® con Bio Console ADI 1035 y Bio Controller ADI 1030, equipado con impulsores de flujo radial, propelas tipo Turbina Rushton y baffles. (Figura 3)

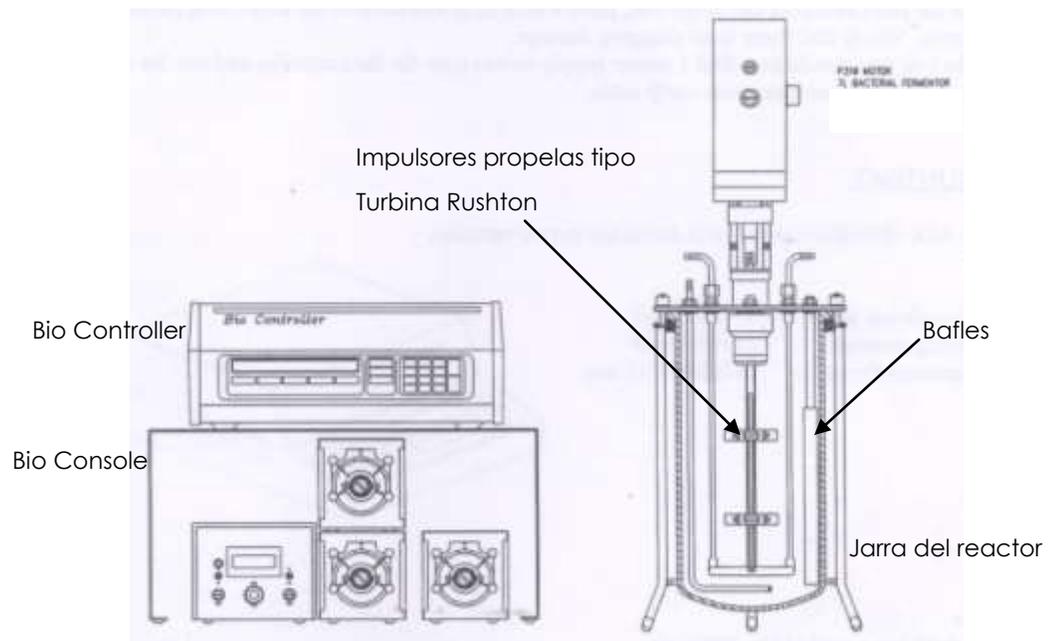


Figura 3 Reactor de 3L marca Applikon®

Para estas pruebas se utilizó el reactor de 3 L con 1 L de volumen de trabajo. La jarra del reactor fue esterilizada con el extracto de levadura en 550 ml de agua destilada, después se agregó el pericarpio de maíz y el CaCO_3 disuelto. El reactor fue inoculado con 50 ml de un cultivo de *B. megaterium* MS2 en medio IPO. El cultivo, fue incubado a 28°C , en virtud de los resultados positivos obtenidos al utilizar esta temperatura, y 170 rpm, velocidad mínima de agitación con la que se logró suspender el pericarpio de maíz en el líquido de fermentación, durante 120 h, tomando muestras cada 24 h para cuantificación de fenoles totales y crecimiento. Al igual que en los matraces, el CaCO_3 fue solubilizado en una quinta parte del volumen total del cultivo y esterilizado por separado. Todos los experimentos realizados en el reactor se analizaron por triplicado.

4.4.10.1 Influencia de AF libre en la hidrólisis microbiana del pericarpio de maíz

Para determinar el efecto de la presencia de AF en el caldo de fermentación sobre la hidrólisis microbiana de AF, se preparó el medio IPO utilizando pericarpio de maíz lavado. El lavado del pericarpio de maíz consistió en esterilizar 20 g de pericarpio por separado en un matraz de 250 ml con 200 ml de agua. Después de la esterilización

se eliminó el líquido y se sustituyó con el mismo volumen de agua caliente estéril, para posteriormente ser adicionado a la jarra del reactor.

Se inició el cultivo incubando a 28°C con 170 rpm de agitación, sin control de pH y sin aireación. Se tomaron muestras cada 24 h por un período de 120 h, se monitoreó el pH, crecimiento microbiano y concentración de fenoles totales.

4.4.10.2 Efecto de la aireación sobre la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Para determinar el efecto de la aireación sobre el crecimiento e hidrólisis de AF se realizaron tres experimentos. En el primero, el microorganismo se hizo crecer aireando constantemente el reactor por 72 h, la tensión de oxígeno disuelto se monitoreó durante todo el cultivo.

El segundo experimento consistió en eliminar la aireación de tal manera que sólo quedó disponible el oxígeno del espacio de la cabeza de la jarra del reactor.

Finalmente el tercer experimento consistió en airear por 24 h el cultivo, después de este tiempo se suspendió el suministro de oxígeno.

Los cultivos se incubaron a 28°C, 170 rpm y sin control de pH por 72 h, tomando muestra cada 24 h para determinar la concentración de fenoles totales, crecimiento y pH.

4.4.10.3 Efecto del control de pH en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Se realizó un cultivo en el cual se controló el pH a 10 a través de la adición de NaOH 0.5 M y HCl 0.5 M. El cultivo se mantuvo a 28°C y 170 rpm por 120 h, las muestras se tomaron cada 24 h analizando el crecimiento y la concentración de fenoles totales.

4.4.10.4 Efecto de la velocidad de agitación en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

En este experimento se varió la velocidad de agitación en el reactor, los valores seleccionados fueron 170 y 210 rpm, considerando el límite superior para evitar daños al microorganismo. El cultivo se incubó a 28°C y el pH se mantuvo en 10 durante 120 h

para cada velocidad de agitación utilizada. Las muestras se tomaron cada 24 h analizando crecimiento celular y concentración de fenoles totales.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Selección de álcalis como componentes del medio de cultivo

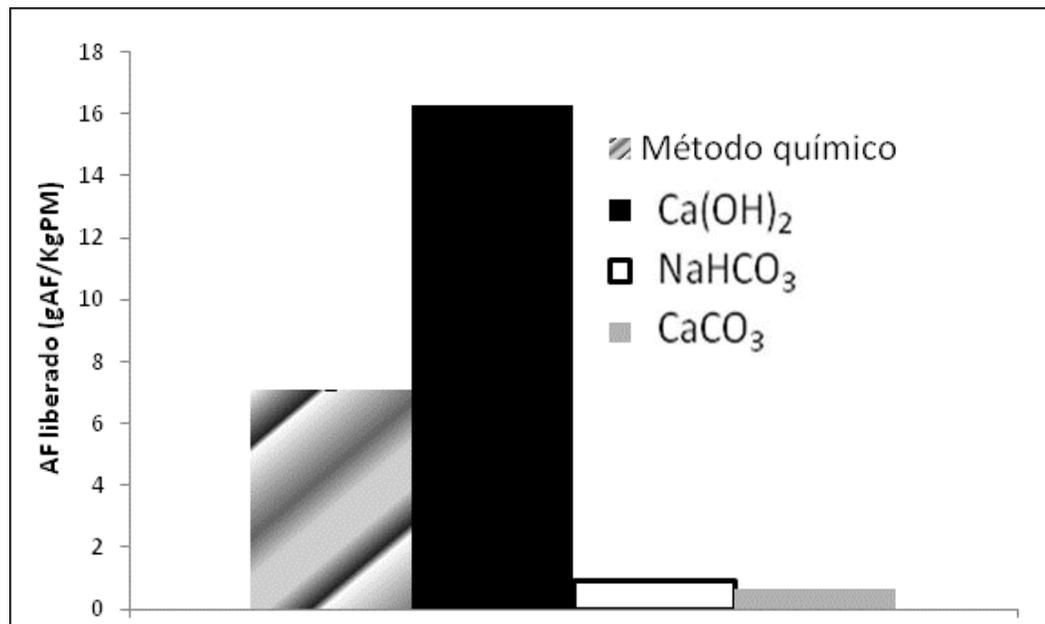


Figura 4. Selección de álcalis como componentes del medio de cultivo

El medio (IP), fue utilizado bajo condiciones alcalinas para el crecimiento del microorganismo. Debido a que parte del pericarpio de maíz es hidrolizado bajo condiciones alcalinas y/o de presión antes de utilizar los medios de cultivo se determinó la posible hidrólisis del pericarpio en el medio de cultivo en presencia de Ca(OH)_2 , CaCO_3 , y NaHCO_3 a pH 10 inicial en todos los medios. Después de la esterilización se midió la concentración de AF y se observó que el medio que contenía Ca(OH)_2 logró un alto nivel de hidrólisis del pericarpio, superior del observado en el método químico.

En la Figura 4 se aprecia que en el método químico se hidrolizó 7 g AF/kg PM y el medio de cultivo IP con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ después de la esterilización liberó 16 g AF/kg PM. La utilización de bases débiles como NaHCO_3 y CaCO_3 liberaron menos de 2 g AF/kg PM, por lo que fueron seleccionados como componentes del medio de cultivo IP.

5.2 Efecto de los álcalis en la liberación de AF por *B. megaterium* MS2

Después de seleccionar los álcalis para el medio de cultivo, se determinó su efecto sobre el microorganismo en la hidrólisis de AF.

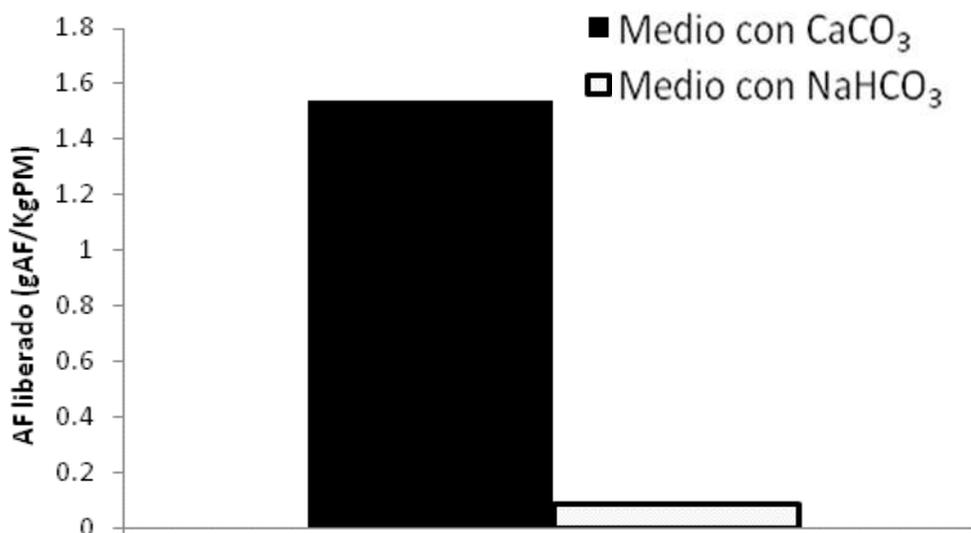


Figura 5. Efecto de la presencia de bicarbonato de sodio y carbonato de calcio en la liberación de AF por *B. megaterium* MS2

En la Figura 5 se observa que el microorganismo liberó mayor cantidad de AF en presencia CaCO_3 que en presencia de Na_2CO_3 a la 72 h.

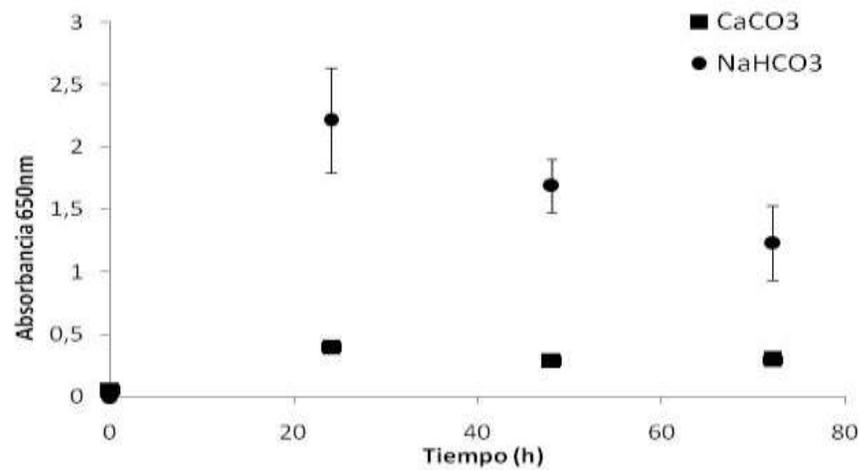


Figura 6. Crecimiento de *B. megaterium* MS2 en presencia de bicarbonato de sodio y carbonato de calcio como componentes del medio de cultivo

En la Figura 6 se aprecia que contrariamente a la liberación de AF, en presencia de CaCO₃ se observa un menor crecimiento que con NaHCO₃.

5.3 Modificación de los componentes del medio de cultivo IP

5.3.1 Influencia de la dextrosa en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

En el medio IP, la dextrosa es la fuente de carbono principal por lo que puede evitar la utilización de otros sustratos, como el pericarpio de maíz. Por lo anterior, se determinó el efecto de la eliminación de esta fuente de carbono en la hidrólisis del AF.

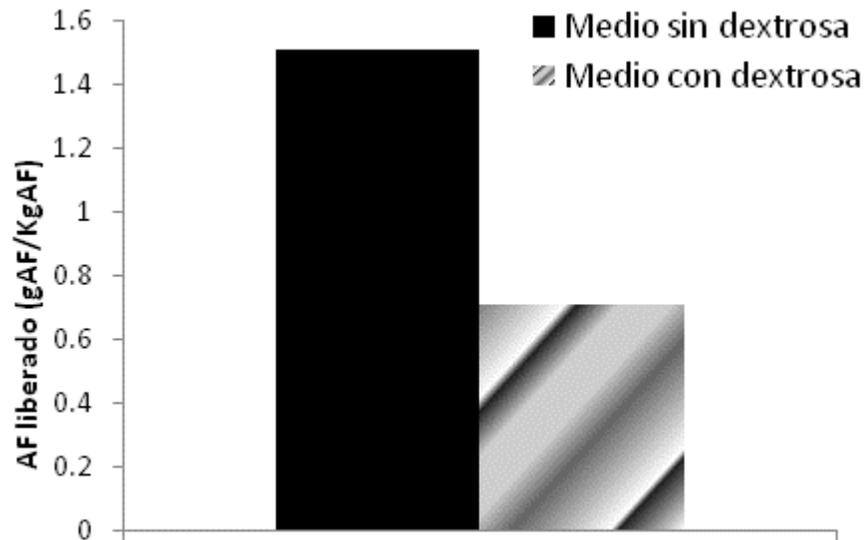


Figura 7. Influencia de la dextrosa en la liberación de AF

En la Figura 7 se observa que cuando la dextrosa no está presente en el medio de cultivo, *B. megaterium* MS2 libera una mayor cantidad de AF, comparado con el medio con dextrosa a las 72 h.

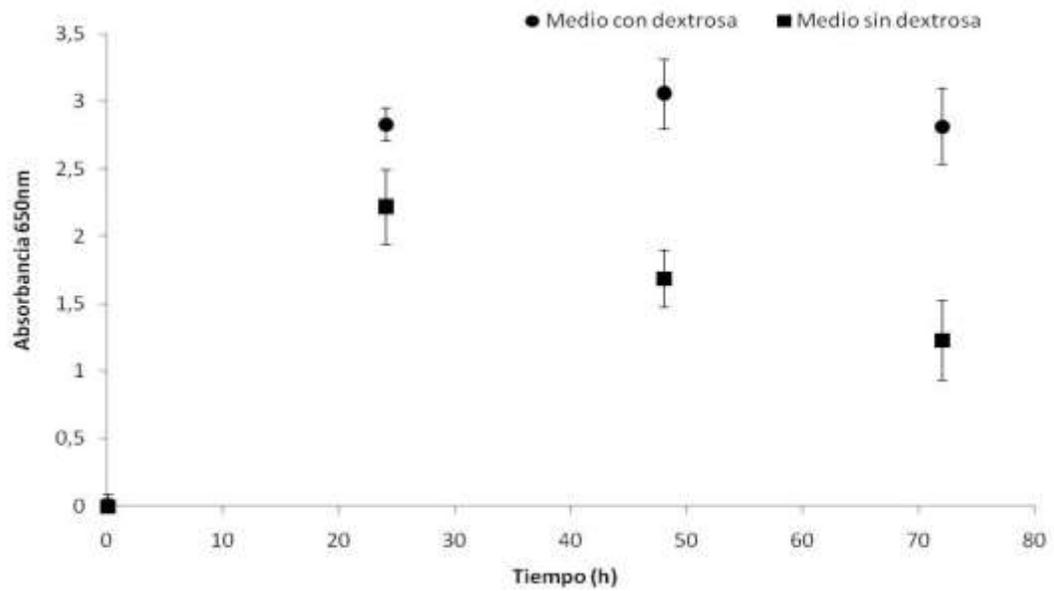


Figura 8. Influencia de la dextrosa en el crecimiento de *B. megaterium* MS2

De acuerdo a la Figura 8 el microorganismo creció mejor en el medio con dextrosa; sin embargo, bajo estas condiciones liberó menor cantidad de AF. Por el contrario, el medio sin dextrosa no favoreció el crecimiento microbiano e incluso se observó decaimiento del mismo, pero se incrementó la cantidad de AF hidrolizada.

5.3.2 Influencia de un medio mineral en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Se determinó el efecto de utilizar un medio mineral en la liberación de AF por *B. megaterium* MS2.

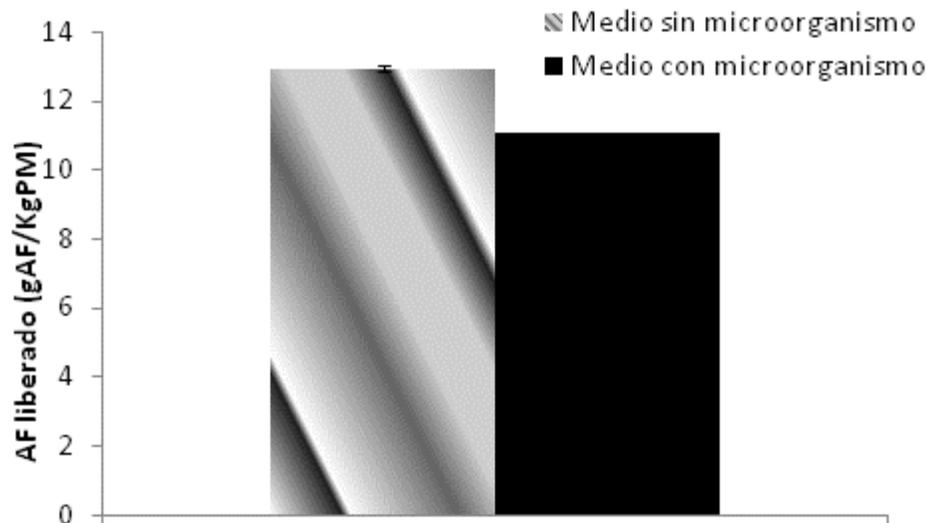


Figura 9. Influencia de un medio mineral en la hidrólisis de AF

Como se puede apreciar en la Figura 9, el medio mineral creó condiciones que favorecieron la hidrólisis química del pericarpio de maíz. El blanco logró hidrolizar mayor cantidad de AF comparado con el medio con microorganismo.

5.4 Efecto de la temperatura en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

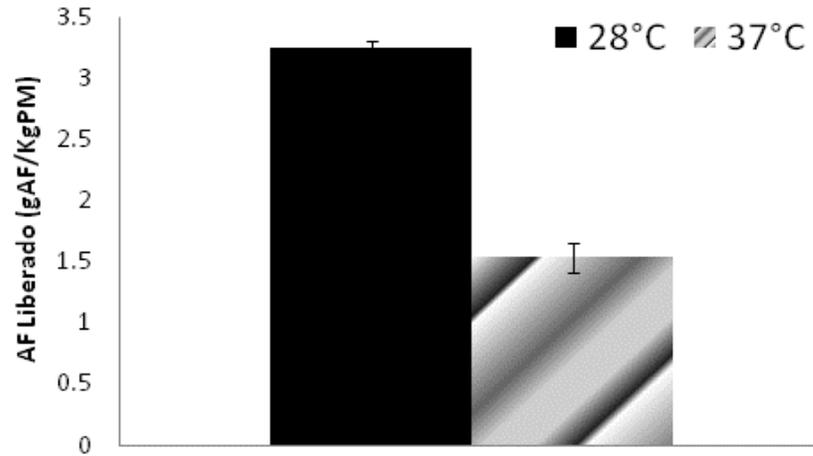


Figura 10. Efecto de la temperatura en la liberación de AF

Se determinó el efecto de la temperatura sobre la hidrólisis microbiana del pericarpio de maíz. Se aprecia en la Figura 10 que *B. megaterium* MS2 hidroliza más ésteres de AF a 28°C que a 37°C a las 72 h.

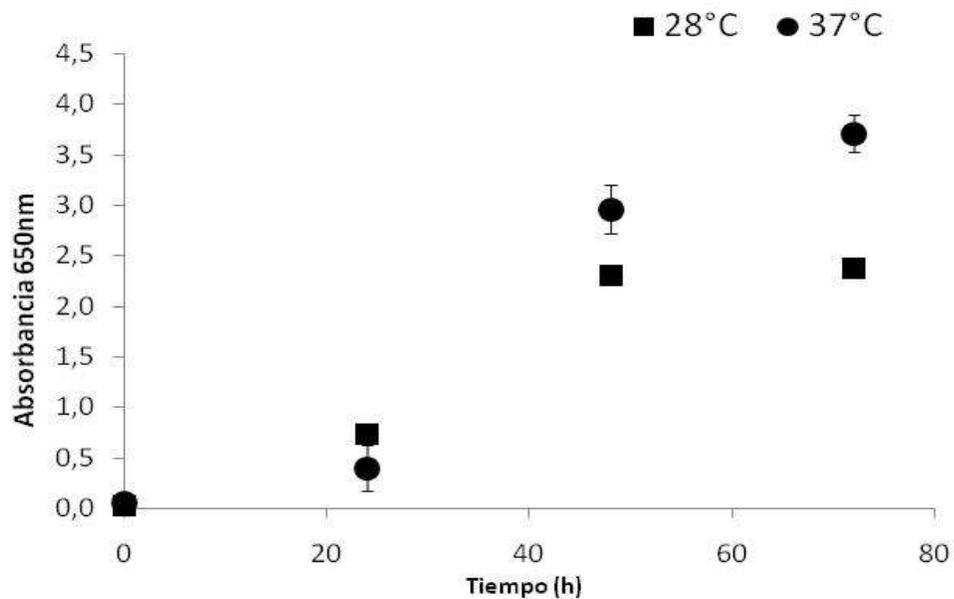


Figura 11. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *B. megaterium* MS2

Por lo que respecta al crecimiento, como en casos anteriores, se observó un menor crecimiento bajo condiciones que favorecen la hidrólisis de ésteres de AF.

5.5 Diseño de experimentos para la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Los resultados obtenidos permitieron definir los componentes importantes del medio de cultivo para la liberación del AF tales como pericarpio de maíz, extracto de levadura y CaCO_3 . Se realizó un diseño factorial 2^3 para encontrar la concentración óptima de estos componentes en el medio de cultivo. En la Tabla III se presentan los 8 experimentos realizados y sus combinaciones.

TABLA III
Experimentos de liberación del AF

| Corrida | PM (g/L) | Extracto de levadura (g/L) | CaCO_3 (g/L) |
|---------|----------|----------------------------|-----------------------|
| 1 | 20 | 5 | 10 |
| 2 | 30 | 5 | 10 |
| 3 | 20 | 10 | 10 |
| 4 | 30 | 10 | 10 |
| 5 | 20 | 5 | 15 |
| 6 | 30 | 5 | 15 |
| 7 | 20 | 10 | 15 |
| 8 | 30 | 10 | 15 |

De acuerdo a la gráfica de probabilidad normal (Figura 12), los factores que afectan en la liberación de AF son la concentración de pericarpio de maíz y las interacciones de concentración pericarpio de maíz-extracto de levadura y pericarpio de maíz-carbonato de calcio.

En la gráfica de cubo (Figura 13) se observa que el punto con mayor cantidad de AF liberado es 1.03 correspondiente al nivel bajo de concentración de pericarpio de maíz y extracto de levadura y nivel alto de carbonato de calcio. Este punto corresponde a 5 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de pericarpio de maíz y 15 g/L de carbonato de calcio. Estas concentraciones fueron utilizadas en el resto de los experimentos.

DESIGN-EXPERT Plot
Concentracion de AF

A: Pericarpio de maíz
B: Extracto levadura
C: Carbonato de calcio

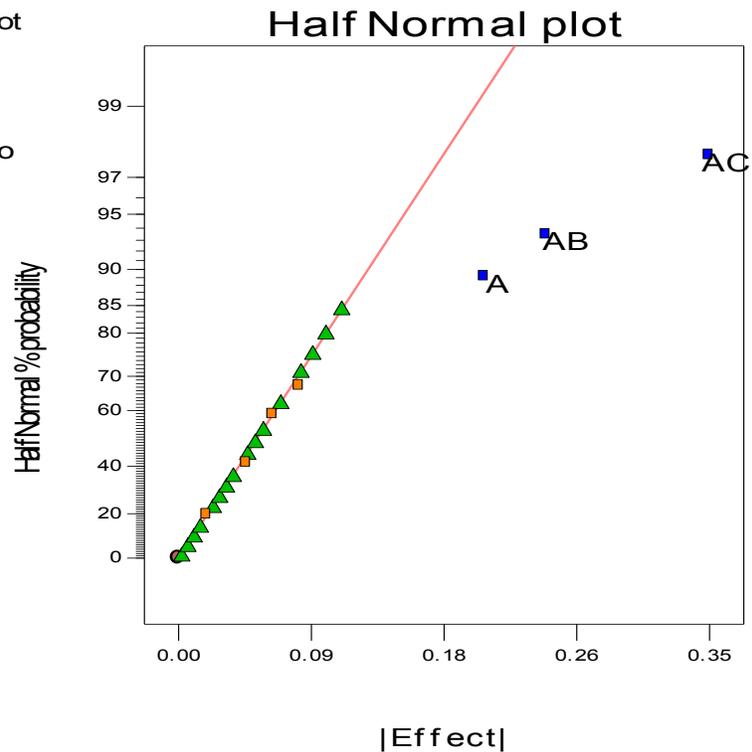


Figura 12. Gráfica de probabilidad normal de los efectos de la liberación de AF. Los tres factores que se analizaron corresponden a dos niveles diferentes de concentración de cada uno de ellos.

DESIGN-EXPERT Plot

Concentración de AF

X = A: Concentración Pericarpio de maíz

Y = B: Concentración Extracto levadura

Z = C: Concentración Carbonato de calcio

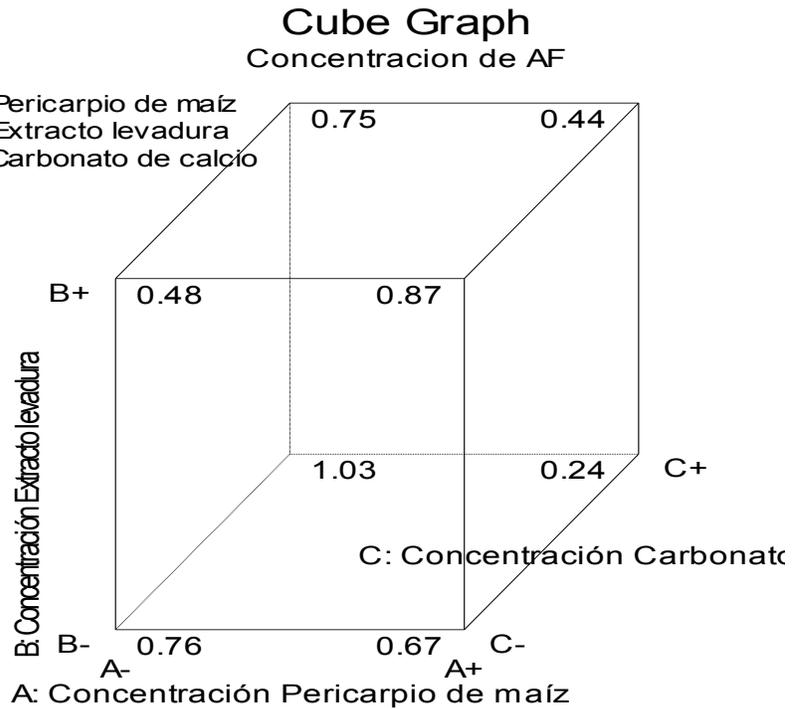


Figura 13. Gráfica de cubo de la liberación de AF

5.6 Pruebas experimentales en reactor de 3 L

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2 en un fermentador de 3 L.

5.6.1 Influencia de AF libre en la hidrólisis microbiana del pericarpio de maíz

Existe una porción de AF no asociada covalentemente al pericarpio de maíz, ésta fracción es obtenida al poner el pericarpio en contacto de agua caliente o solventes orgánicos. Debido a que el AF no asociado puede disolverse en el medio de cultivo bajo condiciones de esterilización, se analizó el efecto que tiene la presencia de AF en el medio de cultivo sobre la hidrólisis de ésteres de AF.

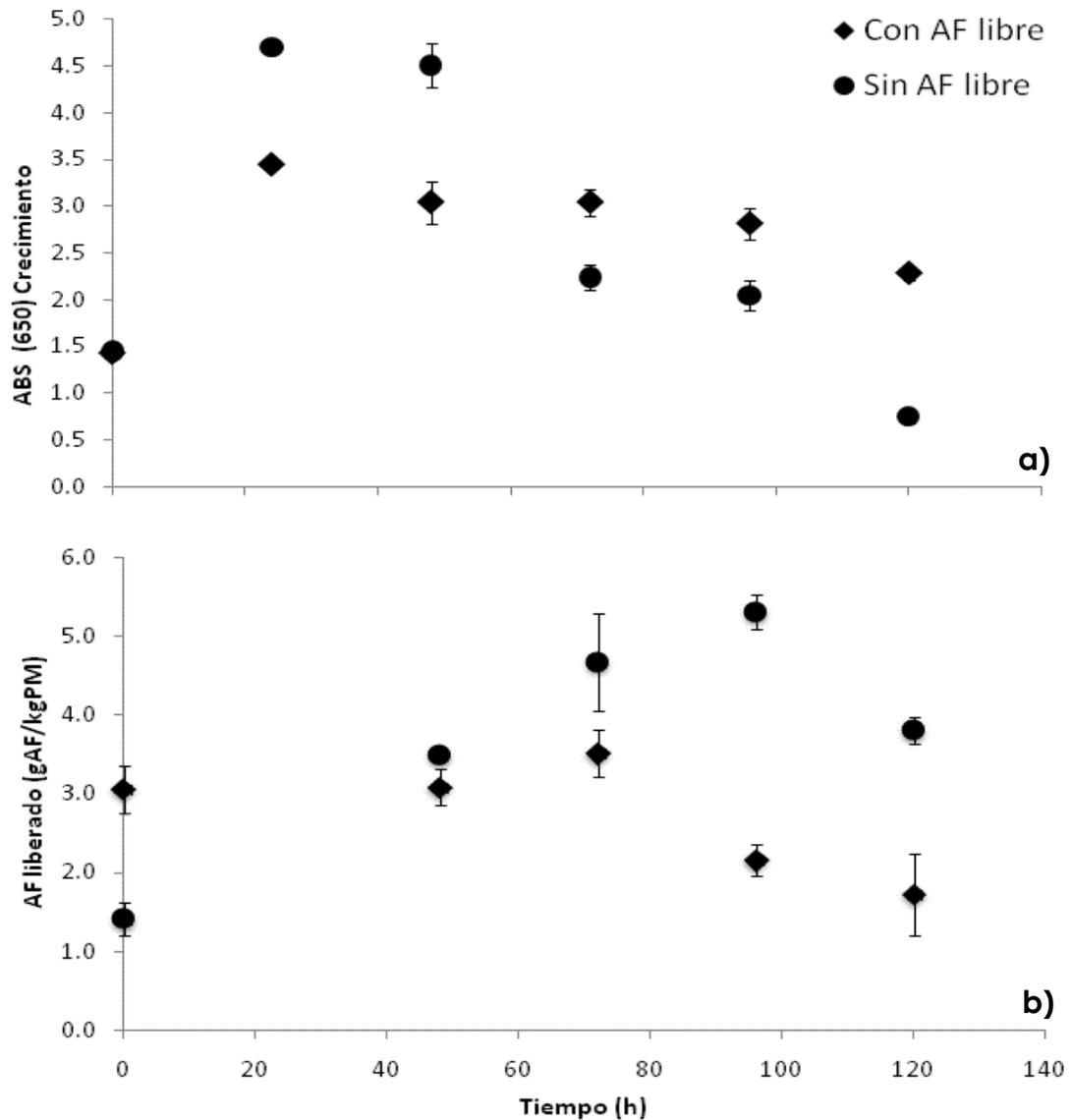


Figura 14. Efecto de la eliminación de AF libre

De acuerdo a la Figura 14b, la presencia de AF libre en el medio de cultivo influye negativamente en la hidrólisis enzimática del AF esterificado, debido a que cuando se elimina se logra un alto grado de hidrólisis y aunque en la Figura 14a hubo un mayor crecimiento en el sistema sin AF libre, se observa la muerte del microorganismo a partir de las 72 h.

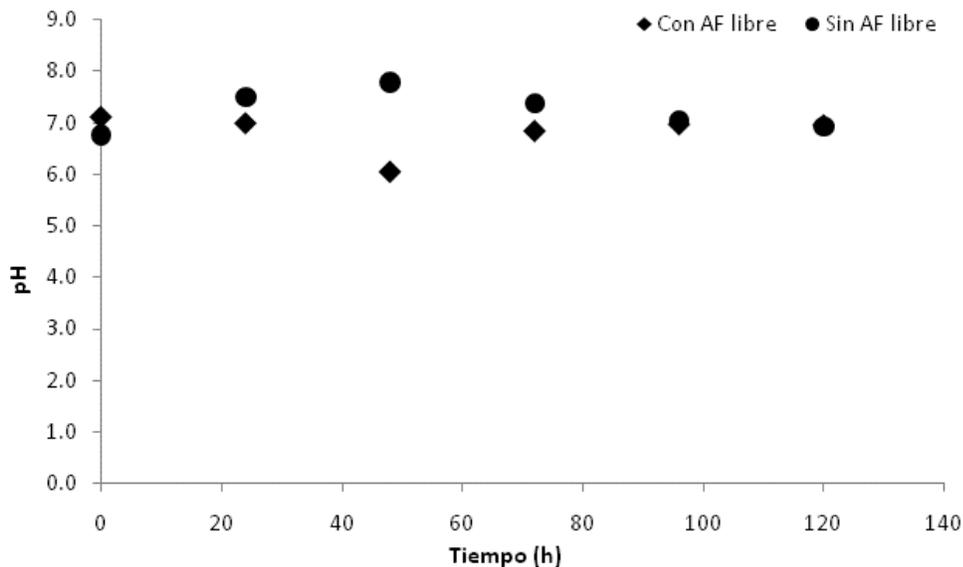


Figura 15. Efecto de la eliminación de AF libre en el pH del medio de cultivo

En la Figura 15 se observa que para esta prueba, nivel reactor, no fue posible mantener el pH alcalino solo con el CaCO_3 .

5.6.2 Efecto de la aireación sobre la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Se realizaron tres experimentos para determinar el efecto de la aireación sobre la liberación de AF por *B. megaterium* MS2.

En el primer experimento el reactor fue aireado durante todo el cultivo. En la Figura 16 se observa que la liberación de AF bajo estas condiciones fue mínima. Sin embargo en la Figura 17 se aprecia que el microorganismo creció abundantemente.

Por otra parte, cuando se eliminó la aireación, se observó un aumento en la liberación de AF. El crecimiento en este segundo experimento fue menor respecto al primero.

Finalmente en el tercer experimento se aireó el sistema solamente por 24 h manteniendo sin aireación posterior. Como se aprecia en la Figura 16, el microorganismo logró liberar una mayor cantidad de AF a las 72 h y aunque se aprecia mayor crecimiento que en el sistema sin aireación, se observó la muerte del microorganismo a partir de las 50 h (Figura 17).

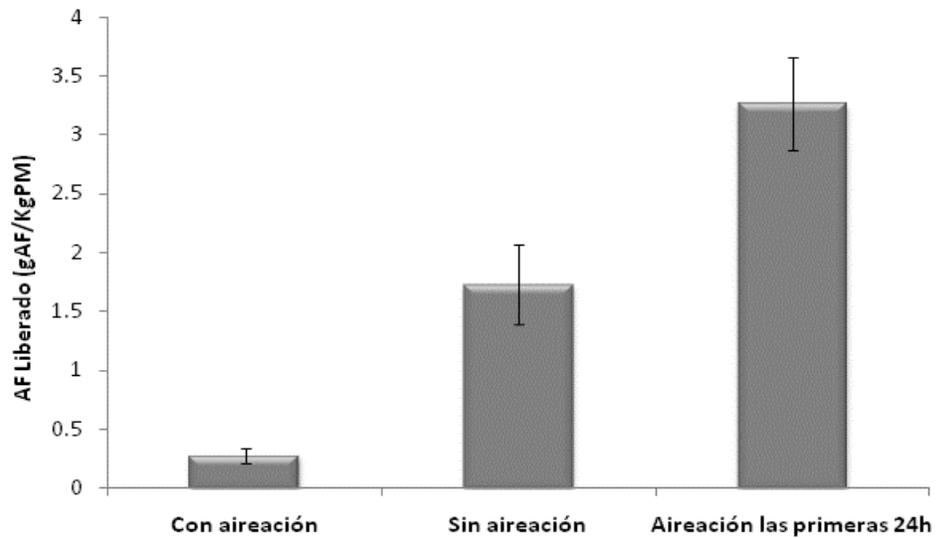


Figura 16. Efecto de la aireación sobre la liberación de AF

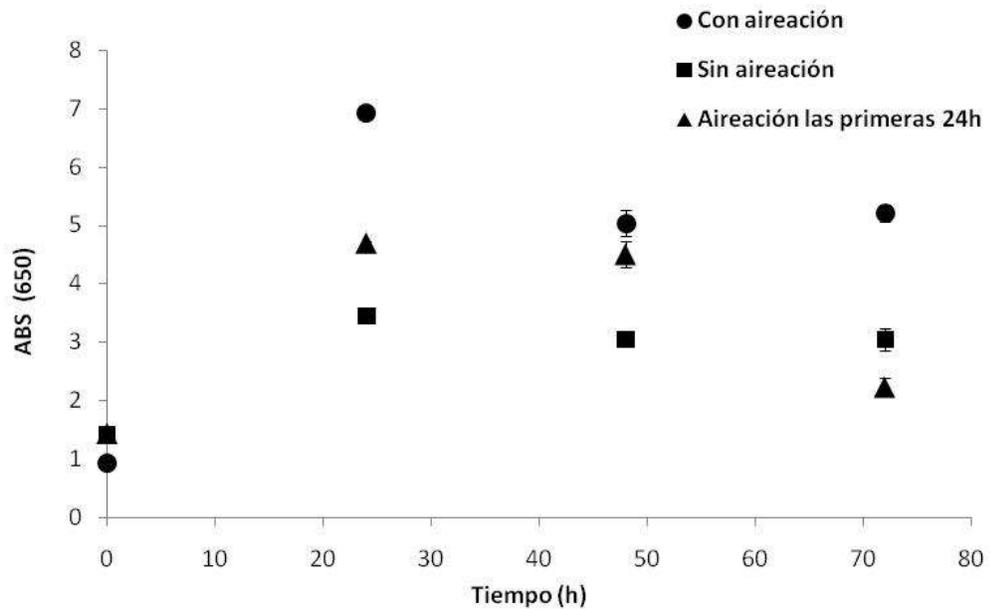


Figura 17. Efecto de la aireación en el crecimiento de *B. megaterium* MS2

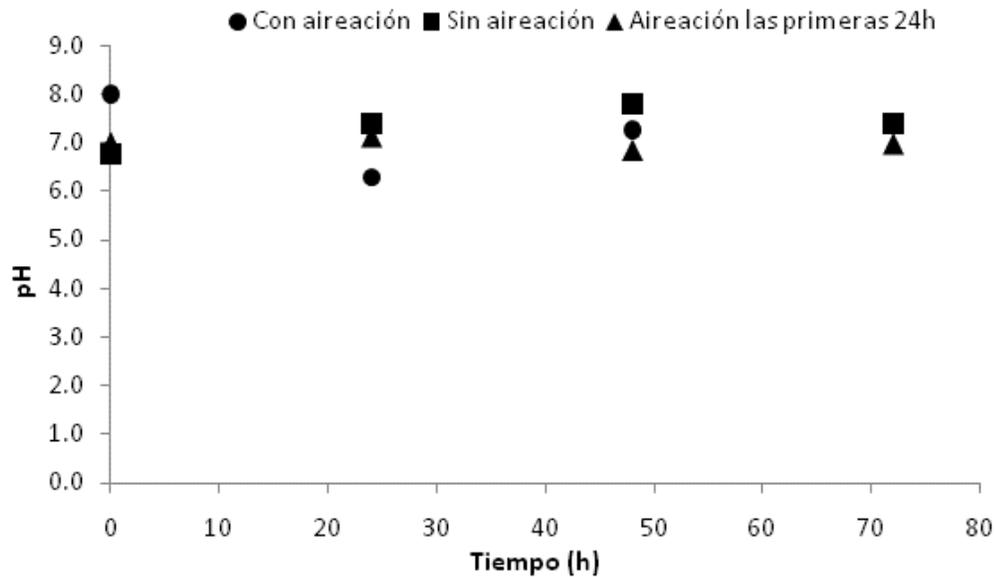


Figura 18. Efecto de la aireación sobre el pH del medio de cultivo

En la Figura 18 se aprecia, que al igual que el experimento anterior, no fue posible mantener el pH alcalino en el reactor utilizando solo el CaCO_3 como buffer en ninguno de los tres experimentos.

5.6.3 Efecto del control de pH en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

El reactor permitió controlar el pH a 10 del medio de cultivo durante el crecimiento de *B. megaterium* MS2. Los resultados obtenidos se compararon con un cultivo sin control de pH.

En la Figura 19b se observa que controlando el pH durante todo el experimento se obtuvo mayor liberación de AF comparado con un sistema sin control de pH. Por lo que respecta al crecimiento (Figura 19a) en el cultivo con control de pH, el microorganismo entró en su etapa de muerte a las 72h y obtuvo mayor cantidad de AF liberado a las 96h. En contraste, cuando no se controla el pH del cultivo, el microorganismo entró a su etapa de muerte hasta las 96h y obtuvo menor liberación de AF a las 96h.

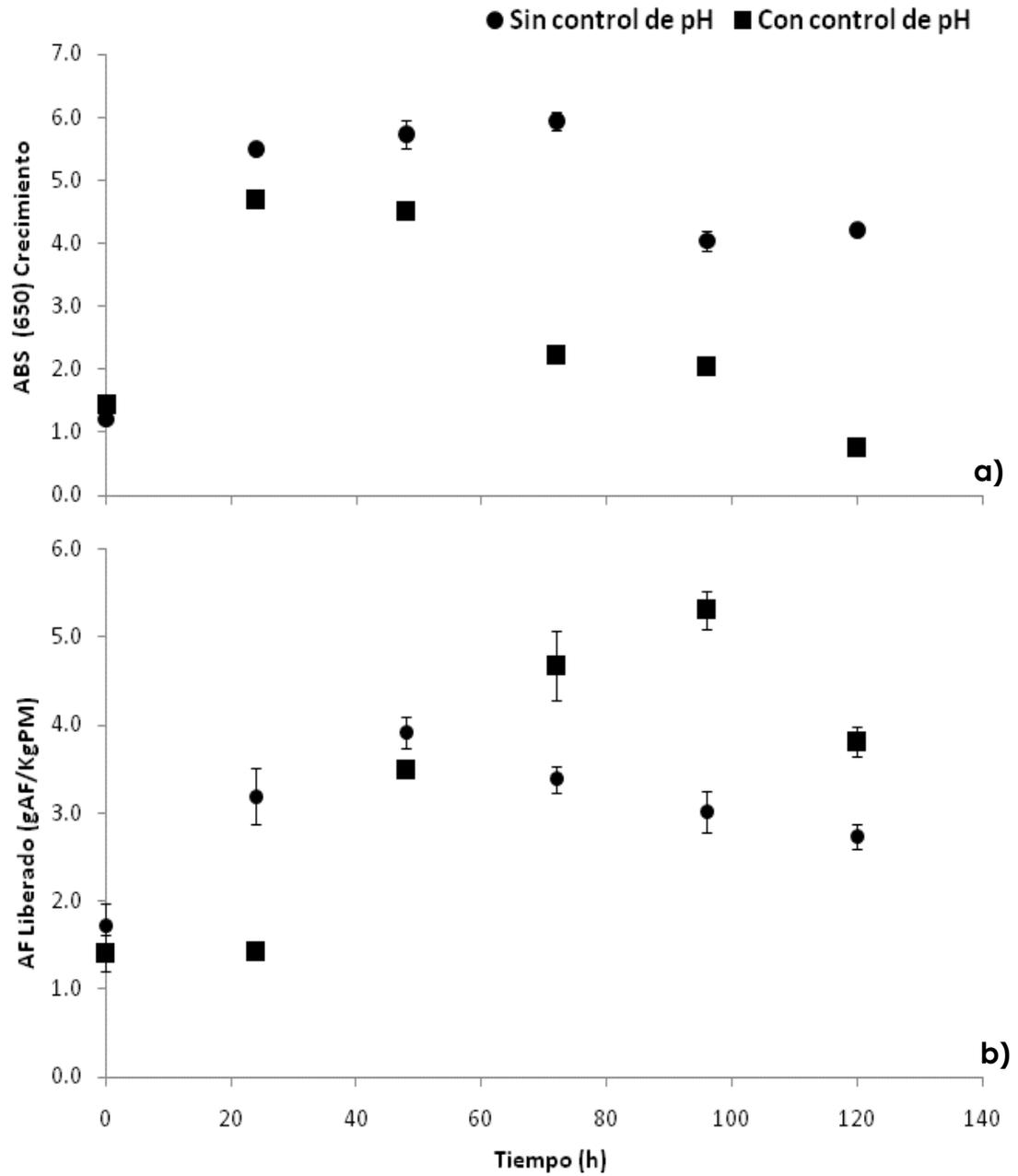


Figura 19. Efecto del control de pH sobre la liberación de AF del pericarpio de maíz y crecimiento de *B. megaterium* MS2

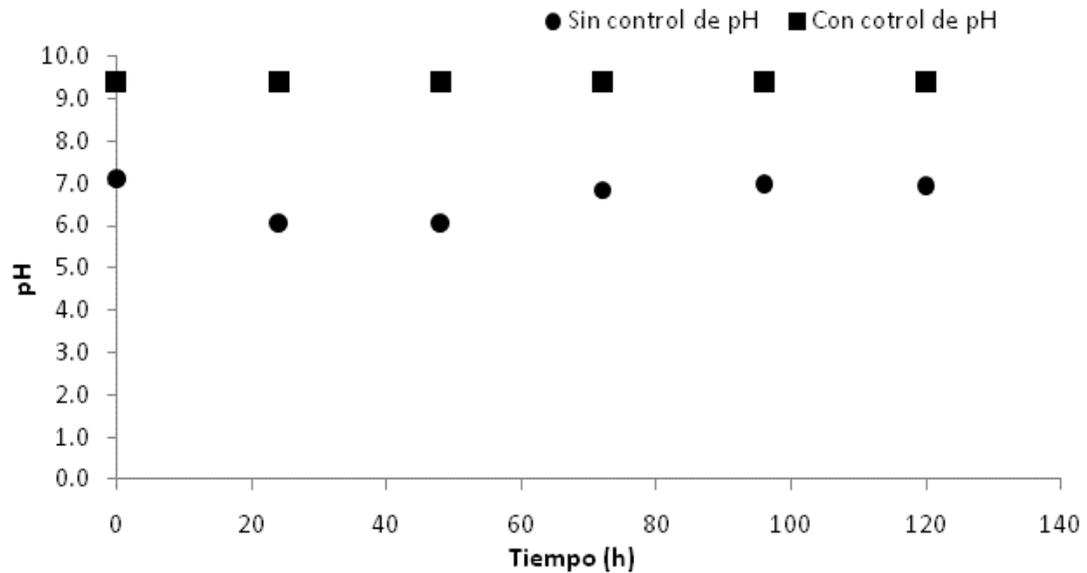


Figura 20. Efecto del control de pH sobre el pH del medio de cultivo

En la Figura 20 se aprecia que con la utilización de soluciones de NaOH y HCl se logró mantener el pH en 10 durante todo el cultivo en el reactor de 3 L.

5.6.4 Efecto de la velocidad de agitación en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Debido a que el pericarpio de maíz es un residuo insoluble la velocidad de agitación es muy importante en la liberación del AF. Se utilizaron dos velocidades de agitación 170 rpm con la cual el pericarpio se mantenía en suspensión y 210 rpm.

Como se aprecia en la Figura 21b, a 210 rpm se obtuvo mayor cantidad de AF liberado que a 170 rpm. En cuanto al crecimiento, Figura 21a, se obtuvo un mejor crecimiento a 210 rpm que a 170 rpm; sin embargo, sigue la misma tendencia que en los anteriores experimentos, en la etapa de muerte se obtiene la mayor cantidad de AF liberado, en ambas velocidades de agitación.

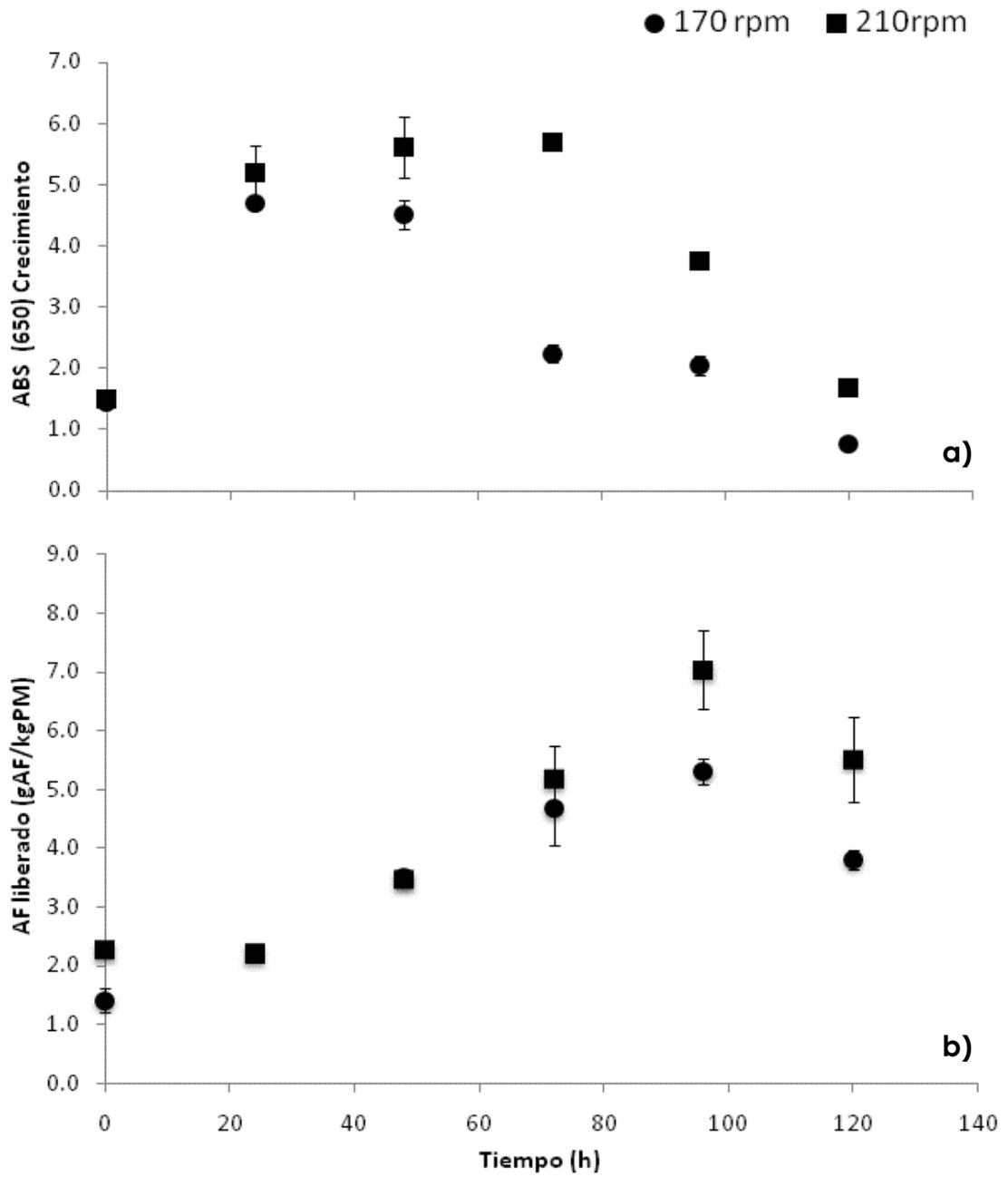


Figura 21. Efecto de la velocidad de agitación en la liberación de AF del pericarpio de maíz y en el crecimiento de *B. megaterium* MS2

5.7 Rendimiento en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Se compararon los rendimientos obtenidos microbianamente (matraz y reactor agitado), con la hidrólisis química. En la Figura 22 se observa que a nivel reactor de 3 L se obtuvo un rendimiento del 50% de liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2 con respecto a la cantidad de AF liberado químicamente con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (sección 5.1). Con respecto a nivel matraz se obtuvo entre un 10-15% de rendimiento también en comparación con la cantidad de AF liberado químicamente con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como álcali del medio IP.

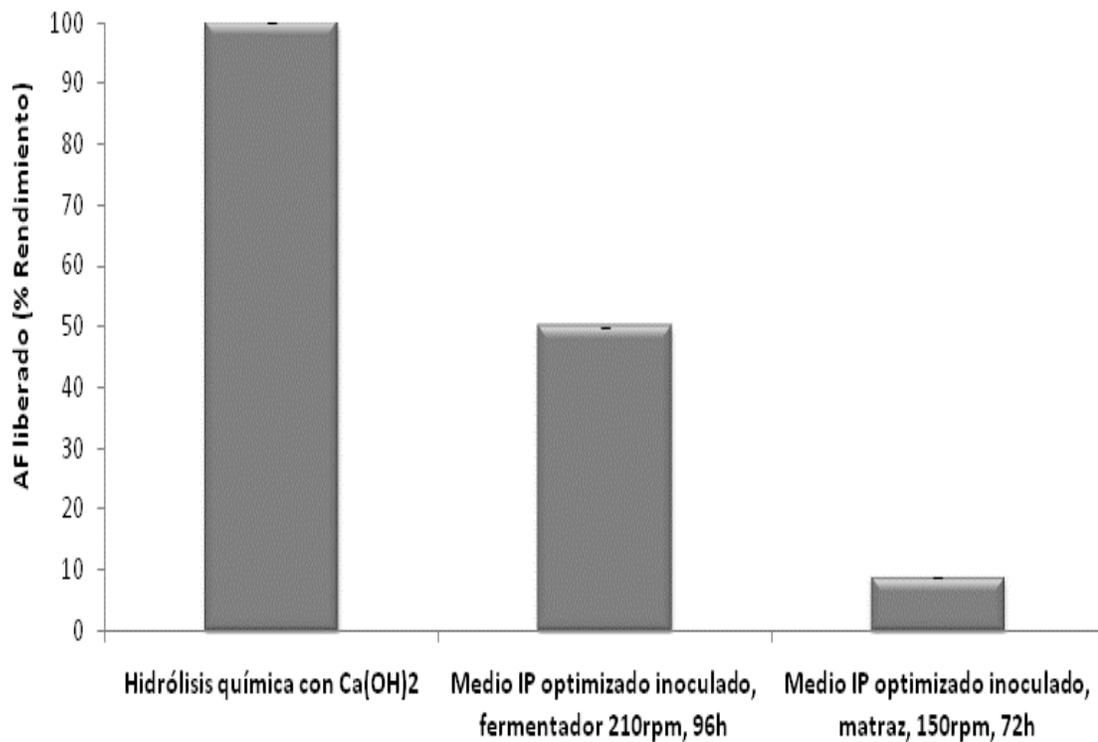


Figura 22. Rendimiento de la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

5.8 Diagrama del sistema para la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2

Un proceso es un conjunto de operaciones químicas y/o físicas ordenadas a la transformación de unas materias iniciales en productos finales diferentes. Un producto es diferente de otro cuando tenga distinta composición, esté en un estado distinto o hayan cambiado sus condiciones.²⁵

En la descripción general de cualquier proceso existen diferentes operaciones involucradas. Unas llevan diversas reacciones químicas, en cambio otros pasos son meramente físicos, es decir, sin reacciones químicas presentes. Podemos decir que cualquier proceso que se pueda diseñar consta de una serie de operaciones físicas y químicas. Cada una de estas operaciones es una operación unitaria dentro del proceso global.²⁶

De acuerdo a los resultados obtenidos, se tiene un diagrama de flujo donde se resumen las operaciones unitarias involucradas en la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2.

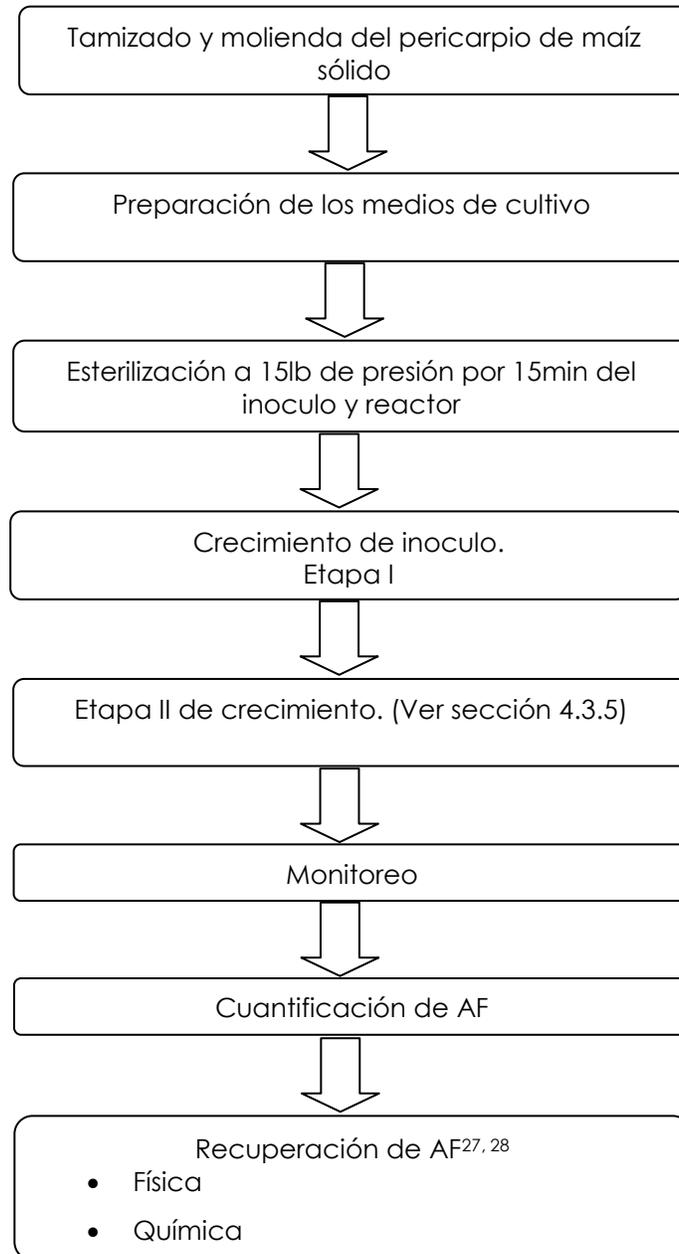


Figura 23 Diagrama de flujo del sistema para la liberación de AF del pericarpio de maíz

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El pericarpio de maíz contiene un alto porcentaje de hemicelulosa, el AF juega un papel importante en la estructura de este polímero. La hemicelulosa es insoluble en agua, sin embargo, la temperatura, presión y la presencia de álcalis, facilitan su solubilización.²⁹ De acuerdo a los resultados obtenidos, el hidróxido de calcio como componente del medio de cultivo IP, hidrolizó químicamente el pericarpio de maíz cuando se probó sin microorganismo (sección 5.1). Esta hidrólisis puede deberse a que parte de la hemicelulosa es solubilizada durante la esterilización y al estar en presencia un álcali fuerte como el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ favorece la hidrólisis química del AF total presente en el pericarpio de maíz.

Ésta hidrólisis aumentó, más del doble, la cantidad de AF liberado del pericarpio de maíz por el método químico; sin embargo, este resultado no es ventajoso para las metodologías biológicas, presenta un obstáculo ya que no hay materia prima sobre la que actuar.

Por lo anterior, el uso de bases débiles, no solo ayudó a mantener el pH, sino que evitó la hidrólisis del pericarpio de maíz. A este respecto, las sales de calcio favorecieron la liberación microbiana de AF. Reportes indican que en microorganismos alcalófilos, el calcio favorece la actividad enzimática.²¹

Bacillus megaterium MS2 fue aislado del nejayote. Para su crecimiento, se diseñó un medio de cultivo sin embargo, este medio no favorecía la hidrólisis microbiana de ésteres de AF por lo que fue necesario modificar sus componentes. La dextrosa era la fuente de carbono principal, pero se determinó que era un inhibidor catabólico en la utilización de la hemicelulosa como fuente de carbono y por lo tanto impidió la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2.¹⁸

La fuente de nitrógeno en el medio IP es el extracto de levadura. El extracto de levadura sirve como fuente de carbono, energía y nitrógeno. Contiene aminoácidos, péptidos, nucleótidos, ácidos orgánicos, vitaminas y minerales, por lo que su presencia en el medio de cultivo puede inhibir catabólicamente la utilización de hemicelulosa. Se eligió un medio mineral cuya fuente de nitrógeno es el sulfato de amonio, este medio creó condiciones que favorecieron la hidrólisis química del pericarpio de maíz y la subsecuente liberación de AF, debido a que algunos compuestos utilizados en este medio mineral son álcalis fuertes.^{29, 30}

Los componentes importantes del medio de cultivo para la liberación de AF son por lo tanto, el pericarpio de maíz, extracto de levadura y carbonato de calcio (CaCO_3).

El crecimiento del microorganismo en un reactor agitado logró aumentar el rendimiento 4 veces respecto a lo que se tenía en matraz. Lo anterior debido a que se incrementó el área de contacto entre el microorganismo y su sustrato. Se utilizó un impulsor de propela tipo Rushton, que permitió la adecuada distribución del sustrato y células. Por otra parte, al aumentar la velocidad de agitación se mejoró la liberación de AF, debido al incremento en la homogeneidad del medio de cultivo.^{31, 32}

Bacillus megaterium MS2 es una bacteria alcalófila facultativa y presenta crecimiento en un amplio intervalo de pH. Este microorganismo produce ácidos a partir del consumo de varios azúcares, ocasionando la acidificación del medio de cultivo. El control del pH en el reactor, incrementó la liberación de AF por *B. megaterium* MS2, debido a que el microorganismo produce enzimas extracelulares con capacidad de ser activadas a pH alcalinos, por eso mantener un pH alcalino durante todo el experimento favoreció la activación de las feruloil esterasas en el microorganismo.³³

B. megaterium MS2 crece abundantemente en sistemas aireados, se determinó que las condiciones que favorecían el crecimiento abundante del microorganismo y que disminuían las probabilidades de muerte del mismo, no favorecen la liberación de AF. El airear por 24h favoreció el crecimiento celular y suspender posteriormente la aireación provocó el inicio de la etapa de muerte en menor tiempo, ocasionando la liberaron de más enzimas, aumentando así la liberación de mayor cantidad de AF.

Debido a que en la etapa de muerte hay lisis y las enzimas asociadas al paquete celular son liberadas al sistema. Estas enzimas, como las feruloil esterasas, empiezan a actuar sobre sus sustratos observándose la liberación de productos. Es necesario, por lo tanto, tener un gran número de células para que al romperse liberen una mayor cantidad de enzimas.³¹

Existen escasos reportes en la literatura acerca de procesos bacterianos utilizados para la liberación de AF. Este es el primer reporte de una bacteria alcalófila utilizada para la catálisis de este tipo de reacción.

Los resultados indican que el AF presente en el pericarpio de maíz es liberado sustentablemente mediante un sistema utilizando *B. megaterium* MS2.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Bacillus megaterium MS2 es una herramienta para la liberación de AF presente en el pericarpio de maíz, esta liberación de AF es afectada por los componentes del medio de cultivo. Los componentes importantes son el pericarpio de maíz como fuente de carbono, extracto de levadura como fuente de nitrógeno y carbonato de calcio como solución amortiguadora para el control de pH. El calcio, favorece la hidrólisis microbiana, debido a que es necesario para la expresión de enzimas alcalófilas.

El crecimiento de *B. megaterium* MS no está ligado a la liberación de AF, debido a que la cantidad de AF liberada es mayor en la etapa de muerte del microorganismo.

La composición óptima del medio de cultivo para la liberación de AF presente en el pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2 es 20g/L de pericarpio de maíz, 5g/L de extracto de levadura, 15g/L de carbonato de calcio, de acuerdo al diseño de experimentos realizado a nivel matraz. El rendimiento de AF liberado enzimáticamente con respecto al AF liberado químicamente fue de 10-15% a nivel matraz y de 50% en reactor de 3 L, debido al efecto de la interacción entre las concentraciones de pericarpio de maíz y carbonato de calcio. El crecimiento de *B. megaterium* MS2 en un reactor aumentó el área de contacto entre el microorganismo y su sustrato, incrementándose la hidrólisis de ésteres de AF.

La presencia de AF libre en el medio de cultivo inhibió la producción de feruloil esterasas y la liberación de AF. La aireación del medio de cultivo es un factor importante para la liberación de AF encontrándose que aireando en la etapa de crecimiento del microorganismo se logra liberar mayor cantidad de AF presente en el pericarpio de maíz. El control de pH a 10 durante todo el cultivo logró aumentar la liberación de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2. Al incrementarse la agitación aumentó la cantidad liberada de AF del pericarpio de maíz por *B. megaterium* MS2.

RECOMENDACIONES

Se propuso un diagrama de flujo de un sistema para la hidrólisis del ácido ferúlico presente en el pericarpio de maíz, sin embargo no está optimizado. Se recomienda la optimización de éste; un pH más alcalino podrá favorecer la producción de feruloil esterasas y la liberación de AF debido a que *B. megaterium* MS2 es alcalófilo. Un tiempo de aireación más corto o una aireación intermitente durante toda la fermentación podría mejorar la liberación de AF. Concentraciones más altas de pericarpio de maíz en el medio de cultivo podrían aumentar la cantidad de AF liberado. Velocidades de agitación más altas podrían influir positivamente en la liberación de AF logrando que los nutrientes estén más disponibles para que el microorganismo los asimile debido a que se podría mejorar el mezclado en el fermentador.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rosazza JPN, Huang Z, Dostal L, Volm T, Rousseau B. **Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product.** Journal of Industrial Microbiology (1995) 15: 457-471.
2. Kafui KA, Rui HL. **Antioxidant Activity of Grains.** Journal of Agricultural and Food Chemistry (2002) 50: 6182-6187.
3. Ou S, Kin-Chor K. **Ferulic Acid pharmaceutical functions, preparation and applications in foods.** Journal of the Science of Food and Agriculture (2004) 84: 1261-1269.
4. Walton NJ, Mayer JM, Narbad A. **Vanillin.** Phytochemistry (2003) 63: 505-515.
5. Faulds CB, Sancho AI, Bartolomé B. **Mono-and dimeric ferulic acid release from brewer's spent grain by fungal feruloyl esterases.** Applied Microbiology Biotechnology (2002) 60: 489-493.
6. La SAGARPA. [En línea] Visitado el 29 de Septiembre de 2007 a las 14:00hrs. <http://www.sagarpa.gob.mx/dlg/chiapas/agricultura/Ciclicos/Maiz.htm#importanciadelcultivo>.
7. La SAGARPA. [En línea] Visitado el 21 de Julio de 2009 a las 17:50hrs. <http://www.sagarpa.gob.mx/testFer/Lists/Lista%20Equis>.
8. Othón SSSR. **Química, Almacenamiento e Industrialización de los Cereales.** 1º edición, AGT Editor S.A. ISBN 968-463-084-0, México (1996)
9. Badui DS. **Química de los Alimentos.** 3º edición, Pearson (1993) 198-200.

10. Martínez-Bustos F, Martínez-Flores HE, Sanmartín-Martínez E, Sánchez-Sinencio F, Chang YK, Barrera-Arellano D, Rios E. **Effect of the components of maize on the quality of masa and tortillas during the traditional nixtamalisation process.** Journal of the Science of Food Agriculture (2001) 81: 1455-1462.
11. Carvajal E, Rascón A, Márquez J, Micard V, Ponce de Leon N, Gardea A. **Maize bran gum: Extraction, characterization and functional properties.** Carbohydrate Polymers (2007) 69: 280-285.
12. Antrim, et al. **Method for treatment of corn hulls.** 4,038,481 Patente de Estados Unidos, 26 de Julio de 1977.
13. Sindhu Mathew, Emilia Abraham T. **Ferulic Acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications.** Critical Reviews in Biotechnology (2004) 24(2-3): 59-83.
14. Panagiotou G, Olavarria R, Olsson L. **Penicillium brasilianum as an enzyme factory; the essential role of feruloyl esterases for the hydrolysis of the plant cell wall.** Journal of Biotechnology (2007) 130: 219-228.
15. Wong, Dominic WS. **Feruloyl esterase a key enzyme in biomass degradation.** Applied Biochemistry and Biotechnology (2006) 133: 87-112.
16. Garcia BL, Ball AS, Rodríguez J, Pérez-Leblic MI, Arias ME, Copa-Patiño JL. **Induction of ferulic acid esterase and xylanase activities in Streptomyces avermitilis UAH30.** FEMS Microbiology Letters (1998) 158: 95-99.
17. Panda T, Gowrishankar BS. **Production and applications of esterases.** Applied Microbiology Biotechnology (2005) 67: 160-169.
18. Hyun-Dong Shin, Rachel Ruizhen Chen. **Production and characterization of a type B feruloil esterase from Fusarium proliferatum NRRL 26517.** Enzyme and Microbial Technology (2006) 38: 487-485.

19. Garcia BL, Ball AS, Rodríguez J, Pérez-Leblic MI, Arias ME, Copa-Patiño JL. **Production and characterization of ferulic acid esterase activity in crude extracts by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339.** Applied Microbiology Biotechnology (1998) 50: 213-218.
20. Topakas E. y Christakopoulos P. **Production and partial characterization of alkaline feruloyl esterases by *Fusarium oxysporum* during submerged batch cultivation.** World Journal of Microbiology and Biotechnology (2004) 20: 245-250.
21. Horikoshi K. **Alkaliphiles.** Harwood Academic Press (1999).
22. Tiago I, Chung AP, Verissimo A. **Bacterial Diversity in a Nonsaline Alkaline Environment: Heterotrophic Aerobic Populations.** Applied and Environmental Microbiology (2004) 70: 7378-7387.
23. Dursun AY, Seda C, Kalayci. **Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on the adsorption of phenol onto chitin.** Journal of Hazardous Material (2005) 151-157.
24. Gámez-de León NE. **Extracción químico-enzimática de ácido ferúlico presente en diferentes variedades de maíz mexicano.** Tesis QFB. UANL (2006).
25. H. Scott Fogler. **Elementos de Ingeniería de las Reacciones Químicas.** 3ª Edición, Prentice Hall, ISBN 970-26-0079-0, México (2001)
26. Web internacional de Ingeniería de las Reacciones Químicas. [En línea] Visitado el 11 de Julio de 2009 a las 21:47hrs <http://www.sc.ehu.es/iawfemaf/>.
27. Valladares-Juárez AG. **Recuperación de ácido ferúlico de subproductos y desechos de la industria de la tortilla.** Tesis MCOPS. UANL (2006).
28. Sandoval-González, RS. **Recuperación de ácido ferúlico de los efluentes de la industria de la tortilla por medio de un proceso de adsorción.** Tesis IQ. UANL (2006).

29. Vanbeneden N, Van Roey T, Willems F, Delvaux F, Delvaux FR. **Release of phenolic flavor precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferúlico acid release during brewing.**
30. Lansing M Prescott, John P Harley, Donald A Klein. **Microbiología.** 5º Edición, Mc Graw Hill Interamericana.
31. Lee, James M. **Biochemical Engineering.** Prentice Hall Inc. Estados Unidos (1992).
32. Sergio Huerta Ochoa. **Reactores enzimáticos.** 1º Edición, Serie publicaciones CBS, ISBN 970-031-0163-1. México (2004).
33. Alex Armando Sáez Vega. **Proteasas alcalinas de una cepa nativa de *Bacillus sp alcalofílico*.** Ingeniería y Ciencia ISSN 1794-9165 (2006) 2(3): 29-38

APÉNDICES

APÉNDICE A

CURVA ESTÁNDAR UTILIZADA PARA CUANTIFICACIÓN DE

FENOLES TOTALES

Apéndice A

Curva estándar utilizada para cuantificación de fenoles totales

Para poder determinar la cantidad de ácido ferúlico en las muestras, es necesario contar con una curva estándar. La curva estándar utilizada en este estudio tiene un rango de concentraciones de 0.01 a 1.0g/l de ácido ferúlico.

Primero se determinaron las absorbancias para las concentraciones de 0.01, 0.03, 0.05, 0.09, 0.14, 0.16 y 0.18g/l de ácido ferúlico. Se preparó una solución madre de 10g/l de ácido ferúlico, del cual se tomaron alícuotas que aforadas a 10ml dieran como resultado las concentraciones antes mencionadas, el solvente utilizado para aforar fue Alcohol Etilico, Se utilizó alcohol etílico en lugar del agua porque el AF solo es soluble en agua caliente.

La determinación de las absorbancias para las concentraciones de 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0g/l de ácido ferúlico se efectuó de la misma manera que para las concentraciones anteriores. Sólo que para estas concentraciones se utilizó una solución madre de 50g/l de ácido ferúlico.

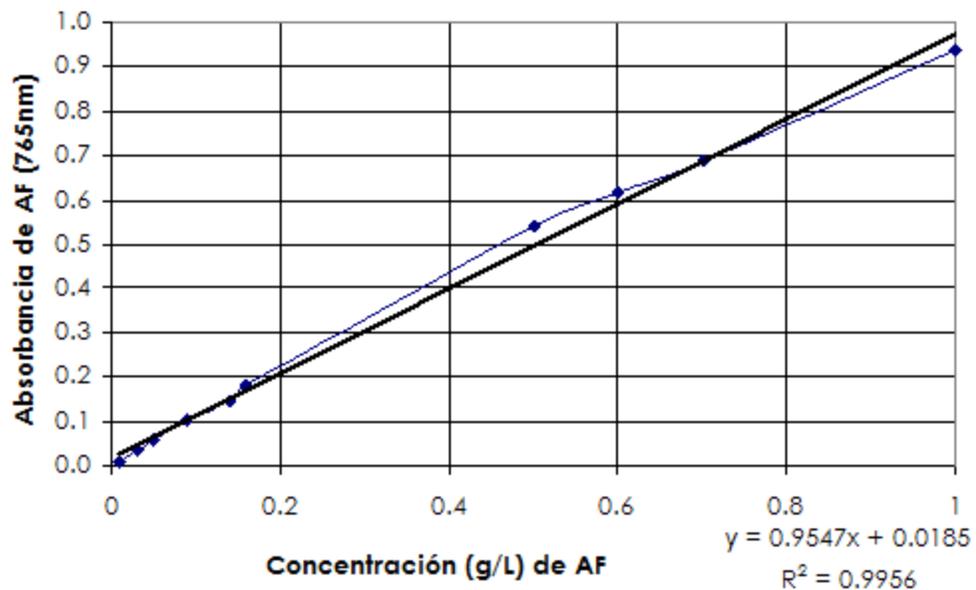


Figura 24. Curva estándar para la cuantificación de fenoles totales

APÉNDICE B

**CURVA ESTÁNDAR UTILIZADA PARA EL MÉTODO DE
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN
(CLAR)**

Apéndice B**Curva estándar utilizada para el Método de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)**

Para poder convertir las áreas bajo la curva en concentración de AF, se utilizó una curva estándar con un rango de concentraciones de 0.01 a 1 g/l.

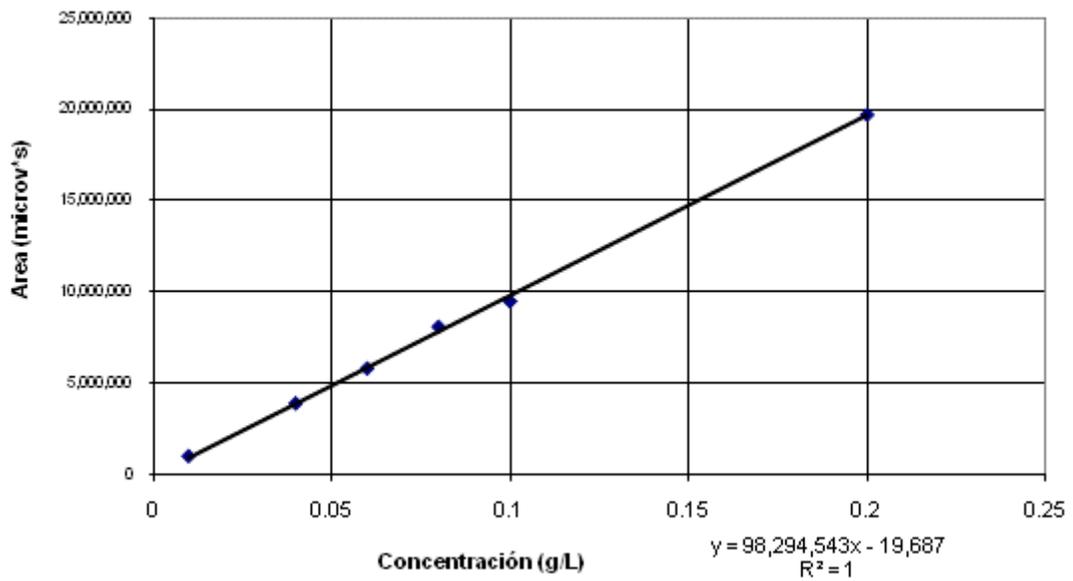


Figura 25. Curva estándar de AF para el CLAR Waters 2695

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Rosalía Simona Sandoval González
Candidata para el Grado de
Maestro en Ciencias con Orientación en Procesos Sustentables

Tesis: DISEÑO DE UN BIOPROCESO PARA LA HIDRÓLISIS DEL ÁCIDO FERÚLICO PRESENTE EN EL PERICARPIO DE MAÍZ

Campo de estudios: Procesos Sustentables

Biografía: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 1 de mayo de 1984, hija de Sergio Manuel Sandoval Tinajero y Ma. de la Luz González Flores.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Ingeniería Química en diciembre del 2005, con Tesis titulada Recuperación de ácido ferúlico de los efluentes de la industria de la tortilla por medio de un proceso de adsorción.

Experiencia Profesional: Ingeniero de Calidad y Logística.