



SELECCIÓN DE CEPAS FUNGICAS PRODUCTORAS DE CLOROGENATO HIDROLASA

Luis V. Rodríguez-Durán¹, Ma. Ascensión Ramírez-Coronel¹, Ernesto Favela-Torres¹, Cristóbal Aguilar-González², & Gerardo Saucedo-Castañeda¹

¹. Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología. C.P. 09340 México, D.F.

². Universidad Autónoma de Coahuila, Departamento de Investigación en Alimentos. C.P. 25280 Saltillo, Coahuila.

rodriguez.lvd@gmail.com

Palabras clave: Clorogenato hidrolasa, ácido clorogénico, fermentación en medio sólido.

Introducción. La clorogenato hidrolasa (CHasa) es una enzima (E.C. 3.1.1.42) que cataliza la hidrólisis de ácido clorogénico (ACI) produciendo cantidades equimolares de ácido quínico (AQ) y ácido cafeico (AC). Esta enzima se ha utilizado principalmente para la producción de AC a partir de subproductos agroindustriales ricos en ACI, como la pulpa de café y el bagazo de manzana (1, 2). La CHasa también puede ser utilizada para la modificación de compuestos fenólicos mediante reacciones de esterificación (3). Estos compuestos tienen importantes actividades biológicas con potencial aplicación comercial. Sin embargo, la falta de CHasas comerciales dificulta el desarrollo de estas aplicaciones. El objetivo de este trabajo fue seleccionar cepas fúngicas capaces de producir CHasa en Fermentación en Medio Sólido (FMS).

Metodología. Se evaluaron 10 cepas fúngicas (9 del género *Aspergillus* y 1 del género *Rhizomucor*) para la producción de CHasa. Estas cepas se inocularon sobre placas de agar con ACI como única fuente de carbono. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 5 días. Se midió el crecimiento radial cada 24 h. A los 3 días de incubación se revelaron cajas con NH₄OH al 28% y se midió el halo de hidrólisis y el índice de potencia (IP=diámetro del halo/diámetro de la colonia). Las cepas que presentaron halos de hidrólisis se utilizaron para la producción de CHasa por FMS. La FMS se llevó a cabo en viales de 4 mL usando 0.3 g de agrolita como soporte inerte y 0.5 mL de un medio líquido con 15 g/L de extracto de café verde como inductor (1). Los viales se incubaron durante 5 días a 30 °C. El contenido de ACI, AC y actividad CHasa en los extractos extracelulares se determinó por HPLC. Las cepas seleccionadas se utilizaron para la producción de CHasa en reactores de lecho empacado con aireación forzada. En estos reactores se determinó además de las variables antes mencionadas, la composición del gas de salida.

Resultados. Todas las cepas evaluadas fueron capaces de crecer en el medio de cultivo utilizado, con tasas de crecimiento de 0.216 a 0.277 mm/h. Sólo las cepas del género *Aspergillus* produjeron halos de hidrólisis (Tabla 1). No se observaron diferencias significativas entre los índices de potencia, por lo que las 9 cepas de *Aspergillus* se utilizaron para la producción de CHasa por FMS. Para todas las cepas se observó una acumulación de AC entre las 8 y las 16 h y un consumo total del ACI y AC antes de las 24 h de incubación (datos no mostrados).

Tabla 1. Tasa de crecimiento radial e índice de potencia de 10 cepas fúngicas usando ACI como única fuente de carbono.

Cepa	Tasa de crec. radial (mm/h)	Índice de potencia
<i>A. awamori</i> NRRL 3112	0.243 ± 0.005 ^{cd}	1.26 ± 0.02
<i>A. japonicus</i> AN5	0.242 ± 0.019 ^{cd}	1.36 ± 0.05
<i>A. niger</i> CH4	0.255 ± 0.008 ^{bcd}	1.29 ± 0.03
<i>A. niger</i> GH1	0.276 ± 0.002 ^{ab}	1.31 ± 0.11
<i>A. niger</i> HT4	0.267 ± 0.003 ^{ab}	1.28 ± 0.08
<i>A. niger</i> PSH	0.277 ± 0.002 ^a	1.23 ± 0.00
<i>A. oryzae</i> 2094	0.246 ± 0.006 ^{cd}	1.23 ± 0.00
<i>A. niger</i> 2095	0.216 ± 0.008 ^e	1.27 ± 0.00
<i>A. tamaritii</i> V12307	0.240 ± 0.008 ^d	1.20 ± 0.00
<i>R. pusillus</i> 23aIV	0.264 ± 0.005 ^{abc}	N.D.

Prueba de Tukey, $\alpha=0.05$

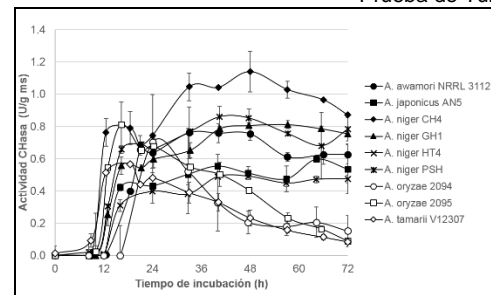


Fig. 1. Actividad CHasa durante la FMS en viales.

Se observaron dos patrones de producción de CHasa (figura 1). Las cepas de *A. tamaritii* y *A. oryzae* alcanzaron la máxima actividad CHasa dentro de las primeras 24 h, pero la actividad decayó rápidamente. Las cepas de *A. awamori*, *A. japonicus* y *A. niger* alcanzaron la máxima actividad CHasa después de las 24 h la cual permanece estable hasta el final del cultivo (72 h). Este segundo grupo se utilizó para la producción de CHasa en reactores de lecho empacado con aireación forzada. En estas condiciones, la cepa de *A. awamori* produjo la mayor actividad CHasa (0.741 U/g ms a las 25 h), pero la cepa CH4 de *A. niger* presentó la mayor productividad (0.047 U/g ms·h a las 14 h de incubación).

Conclusiones. Se pre-seleccionaron 6 cepas fúngicas, de las cuales la cepa NRRL 3112 de *A. awamori* y la cepa CH4 de *A. niger* fueron las más convenientes para la producción de CHasa por FMS a nivel laboratorio.

Bibliografía

- Asther M, Estrada Alvarado M I, Haon M, Navarro D, Asther M, Lesage-Meessen L, Record E (2005) *J Biotechnol.* 115 (1) 47-56.
- Ramírez L, Arrizon J, Sandoval G, Cardador A, Bello-Mendoza R, Lappe P, Mateos-Díaz J C (2008) *Appl Biochem Biotechnol* 151 (2-3) 711-723.
- Kishimoto N, Kakino Y, Iwai K, Fujita T (2005) *Appl Microbiol Biotechnol* 68 (1) 198-202.