

## PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE UNA CLOROGENATO HIDROLASA DE *ASPERGILLUS NIGER* AUTOINMOVILIZADA

Melissa Solís Villafranco<sup>1</sup>, Adilene Sánchez Alaniz<sup>1</sup>, María Alejandra Pichardo Sánchez<sup>2</sup>, Rodolfo Torres de los Santos<sup>1</sup>, Guadalupe Bustos Vázquez<sup>1</sup>, Luis V. Rodríguez Durán<sup>1</sup>.

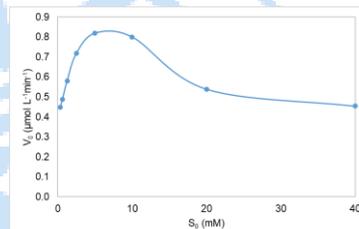
<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Cd. Mante, Tamaulipas, C.P. 89840. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Cd. de México, C.P. 09340. [luis.duran@docentes.uat.edu.mx](mailto:luis.duran@docentes.uat.edu.mx)

*Palabras clave:* Ácido clorogénico, ácido cafeico, hidrólisis.

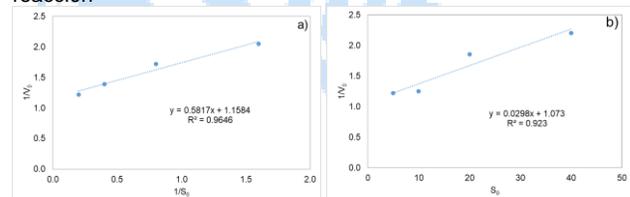
**Introducción.** La clorogenato hidrolasa cataliza la hidrólisis del ácido clorogénico. Esta enzima se puede utilizar para la extracción de ácido cafeico a partir de subproductos agroindustriales (1), así como para la síntesis de derivados bioactivos del ácido cafeico (2). Estos compuestos tienen importantes actividades biológicas y diferentes aplicaciones potenciales. El objetivo de este trabajo fue caracterizar cinéticamente una clorogenato hidrolasa producida por *Aspergillus niger* CR1 en Fermentación en Estado Sólido (FES) y autoinmovilizada en el soporte.

**Metodología.** La FES se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer utilizando perlita como soporte y un medio con ácido clorogénico como fuente de carbono e inductor. El medio de cultivo se inoculó con  $1 \times 10^6$  esporas/mL, se mezcló con el soporte sólido y se incubó durante 48 h a 30 °C. El soporte fermentado se lavó 3 veces con agua destilada, se colocó en columnas de vidrio y se hizo pasar una corriente de aire seco (100 mL/min) hasta alcanzar una humedad menor al 10%. Los sólidos secos se utilizaron para catalizar la hidrólisis del ácido clorogénico en un reactor de doble pared. Se estudió el efecto de la concentración del sustrato en el rango de 0.31 a 40 mM. La reacción se llevó a cabo a pH 6.5 y 37 °C durante 2 h, se tomaron muestras a intervalos regulares, la reacción se detuvo con metanol y se midió la concentración de ácido cafeico por HPLC (3). Se estimó la velocidad inicial de reacción por regresión lineal y se calcularon los parámetros cinéticos por un método de linealización.

**Resultados.** En la Figura 1 se observa que la velocidad de reacción aumenta a partir de la concentración inicial (0.31 mM) hasta la concentración 5 mM, mientras que de la concentración 10 a 40 mM la velocidad de reacción disminuye. Este comportamiento corresponde a la inhibición por sustrato. Se determinaron los parámetros cinéticos del modelo de Michaelis-Menten con inhibición por sustrato ( $K_m$ ,  $V_{max}$  y  $K_i$ ) por el método de Lineweaver-Burk (Figura 2).



**Fig. 1.** Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción



**Fig. 2.** Linealización de los datos cinéticos en la zona sin inhibición (a) y con inhibición (b).

El valor estimado de  $K_m$  (0.50 mM) es cercano para otras clorogenato hidrolasas de *Aspergillus*. Adachi *et al.*, (4) reportaron una  $K_m$  de 0.72 mM para una clorogenato hidrolasa autoinmovilizada de *A. sojae*. Sin embargo, la inhibición por sustrato no se ha reportado para las clorogenato hidrolasas caracterizadas previamente.

**Conclusiones.** La clorogenato hidrolasa autoinmovilizada de *A. niger* CR1 presenta parámetros cinéticos similares a otras clorogenato hidrolasas de *Aspergillus*, pero muestra inhibición por sustrato.

**Agradecimiento.** Al proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica A1-S-29456.

### Bibliografía.

1. Asther, M., Estrada, M.I., Haon, M., Navarro, D., Asther, M., Lesage-Meessen, L. & Record, E. (2005) *J. Biotechnol.* 115, 47-56.
2. Kishimoto *et al.*, (2005), *Appl Microbiol Biotechnol* 68, 198-202.
3. Ferrétiz-Castillo, P.Y., Mendoza-Conde, A.A., Pichardo Sánchez, M.A., Bustos-Vázquez, M.A., Ascasio Valdez, J.A., Aguilar, C.N., Rodríguez-Durán, L.V. (2021). Optimization of chlorogenate hydrolase activity production by *Aspergillus niger* CR1. Memorias del congreso Latin Food 2021. Ameca. Puebla, Puebla.
4. Adachi, O., Ano, Y., Akakabe, Y., Shinagawa, E., & Matsushita, K. (2008). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 143-151.