



**Centro de Investigación en  
Alimentación y Desarrollo, A.C.**

**VALORIZACIÓN DE UN EFLUENTE DE LA INDUSTRIA  
DEL NIXTAMAL PARA LA PRODUCCIÓN  
BIOTECNOLÓGICA DE COMPUESTOS AROMÁTICOS**

---

Por:

**Víctor Eduardo Contreras Jáquez**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

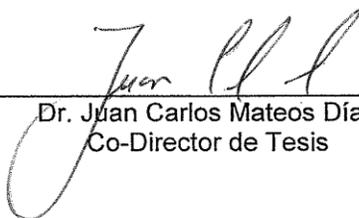
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Víctor Eduardo Contreras Jácquez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dr. Ali Asaff Torres  
Director de Tesis



---

Dr. Juan Carlos Mateos Díaz  
Co-Director de Tesis



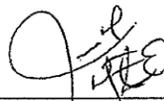
---

Dra. Itzamná Baqueiro Peña  
Asesora



---

Dra. Elisa Valenzuela Soto  
Asesora



---

Dr. Martín Enrique Jara Marini  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca de maestría otorgada.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD), por permitirme alcanzar esta meta académica.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), por abrirme sus puertas y brindarme el apoyo técnico necesario para la realización de mi trabajo experimental de tesis.

A mi Director de Tesis, el Dr. Ali Asaff Torres por haberme permitido ser parte del Laboratorio de Biotecnología Industrial y por todo el conocimiento transmitido a lo largo de este periodo. Especialmente por todo el apoyo incondicional para la realización del trabajo de tesis.

A mi Co-director de Tesis, el Dr. Juan Carlos Mateos Díaz por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo en el Laboratorio de Biotecnología Industrial y brindarme los equipos necesarios para el cumplimiento del trabajo experimental y todos sus consejos y asesorías brindadas.

A la Dra. Itzamná Baqueiro Peña, por todas las asesorías y compartir conmigo su conocimiento en el área de los bioprocesos, además de los valiosos consejos que cada día aportan en mi formación académica.

A la Dra. Elisa Valenzuela Soto, por abrirme las puertas del Laboratorio de Bioquímica de Proteínas de Estrés y especialmente por todos sus consejos y apoyo para la realización del trabajo de tesis.

Al Dr. Martín Jara Marini, por todas las observaciones, consejos y el apoyo brindado durante mi estudio de maestría.

A la Dra. Gabriela Ramos por haberme permitido formar parte de la Coordinación de Ciencia de los Alimentos y por sus palabras de ánimo brindadas.

A los Dres. Jorge Rodríguez, Melchor Arellano, Manuel Reinhart y la Dra. Rosa Camacho, del CIATEJ, por el préstamo de equipos y su apoyo técnico para la realización del trabajo experimental de mi tesis.

A mis amigos del Laboratorio de Biocatálisis Uri, Daniel, Mariana, Doddy, Balam, Daniela, Fabiola, Ricardo, Edgar, Tania y Ángeles por sus consejos y por todos los momentos de diversión a su lado.

Al I.Q. Uri Valenzuela, M.C. Daniel Grajales y a la Dra. Mariana Armendáriz por su invaluable apoyo en toda mi estancia en el CIATEJ y por su valiosa amistad.

Al M.C. Emmanuel Aispuro, a la Q.B. Soco Vallejo, a la M.C. Cony Corrales y al Q.B. Pancho, por su apoyo técnico y especialmente por su amistad brindada.

A mis mejores amigos Cynthia, Yuri, Rocío, Deya, Cristóbal, Alejandra, Karen, Julián, Carmelita, Eli, Pepe, Sandra, Abi y Rodrigo por todos los excelentes momentos que pasamos juntos durante estos dos años y los que vendrán.

A Yuri Aguirre, Rocío Chávez, Deya Fimbres y Ale Preciado por brindarme su valiosa amistad y compartir momentos de risas, diversión, fiesta, trabajo y estrés durante este periodo.

A Cynthia Aguilar Gil por su valiosa amistad y permitirme compartir muchos momentos de alegría a su lado. Especialmente por todas esas palabras de ánimo tanto por teléfono como en persona que me motivaron a dar lo mejor de mí.

A mis padres y hermanos, quienes siempre me han apoyado e impulsado toda mi vida para seguir adelante en mi desarrollo profesional y personal. Agradezco infinitamente el compartir conmigo todos los éxitos y ayudarme a salir adelante en los tropiezos. Son mi ejemplo de vida.

## DEDICATORIA

*A mis padres Lorena del Carmen Jácquez García y Victoriano Contreras Valdéz, y mis hermanos Karla y Luis Alberto. Quienes son mi motivación para superarme día a día en el ámbito personal y profesional. Infinitas gracias por estar conmigo y compartir todos mis logros a lo largo de mi vida.  
¡Los amo infinitamente!*

## CONTENIDO

	Página
LISTADO DE FIGURAS .....	x
LISTADO DE TABLAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
2.1 El Nejayote: Efluente Contaminante Generado en la Nixtamalización del Maíz.....	3
2.2 Tratamiento Integral del Nejayote con un Sistema de Filtración por Membranas.....	5
2.3 Compuestos de Alto Valor Contenidos en el Nejayote y su Aplicación Industrial.....	8
2.4 Métodos de Producción del 4-vinilguayacol .....	10
2.4.1 El 4-vinilguayacol y sus Aplicaciones Industriales .....	10
2.4.2 Síntesis Química del 4-vinilguayacol.....	11
2.4.3 Producción Biotecnológica del 4-vinilguayacol.....	11
2.5 Biotransformación del Ácido Ferúlico a 4-vinilguayacol .....	12
2.5.1 Descarboxilación no Oxidativa del Ácido Ferúlico .....	12
2.5.2 <i>Bacillus megaterium</i> Aislado de Nejayote: una Nueva Cepa para la Descarboxilación del Ácido Ferúlico .....	15
2.5.3 Sistemas de Biotransformación: Células en Crecimiento y Células en Reposo .....	16
2.5.4 Sistema de Biocatálisis: Células Completas .....	17
2.6 Concentrado de Nejayote como Precursor para la Producción Biotecnológica de 4-vinilguayacol.....	19
<b>III. HIPÓTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>IV-. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
4.1-. Objetivo General.....	21
4.2.- Objetivos Específicos .....	21
<b>V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
5.1 Valorización de un Efluente Líquido de la Industria del Nixtamal (Nejayote) Mediante un Sistema Integral de Membranas y Secado por Aspersión .....	22
5.1.1 Obtención y Acondicionamiento de la Muestra .....	22
5.1.2 Microfiltración .....	24
5.1.3 Ultrafiltración.....	24
5.1.4 Ósmosis Inversa (OI) .....	24
5.1.5 Desempeño de las Membranas de Ultrafiltración y Ósmosis Inversa .....	25
5.1.6 Secado por Aspersión .....	25

## CONTENIDO (continuación)

5.1.7 Análisis Fisicoquímico de las Fracciones de Filtración y Polvo Deshidratado .....	25
5.1.7.1 Sólidos disueltos totales (SDT) .....	26
5.1.7.2 Sólidos suspendidos totales (SST) .....	26
5.1.7.3 Azúcares reductores (AR) .....	26
5.1.7.4 Arabinoxilanos (AX) .....	27
5.1.7.5 Fenoles totales .....	27
5.1.7.6 Ácido ferúlico (AF) y <i>p</i> -cumárico (ApC) .....	27
5.1.8 Análisis Estadístico .....	28
5.2 Sistema de Células en Reposo y en Crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> para la Biotransformación de AF a 4VG .....	28
5.2.1 Cultivo Líquido de <i>B. megaterium</i> .....	28
5.2.2 Biotransformación de AF Puro en un Sistema de Células en Reposo .....	29
5.2.3 Biotransformación de AF con Polvo Reconstituido en un Sistema de Células en Crecimiento.....	29
5.2.4 Biotransformación de AF con Nejayote Enriquecido en un Sistema de Células en Crecimiento.....	30
5.2.5 Determinaciones Analíticas .....	30
5.2.5.1 Biomasa .....	30
5.2.5.2 Cuantificación de AF y 4VG .....	30
5.2.6 Parámetros Cinéticos.....	31
5.2.7 Análisis Estadístico .....	32
5.3 Sistema de Biocatálisis con Células Completas de <i>Bacillus megaterium</i> para la Descarboxilación de AF .....	33
5.3.1 Obtención del Biocatalizador .....	33
5.3.2 Actividad Descarboxilasa del Biocatalizador .....	33
5.3.3 Efecto de la Temperatura y pH en la Actividad Descarboxilasa del Biocatalizador.....	34
5.3.4 Sistema de Biocatálisis Monofásico de Células Completas para la Descarboxilación del AF.....	34
5.3.5 Sistema de Biocatálisis Bifásico de Células Completas para la Descarboxilación del AF.....	35
5.3.6 Purificación Secundaria del AF Contenido en el Polvo Deshidratado para la Producción de 4VG.....	35
5.3.7 Parámetros Cinéticos.....	36
5.3.8 Análisis Estadístico .....	36
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
6.1 Valorización de un Efluente Líquido de la Industria del Nixtamal (Nejayote) Mediante un Sistema Integral de Membranas y Secado por Aspersión .....	37
6.1.1 Composición de Nejayote .....	37
6.1.2 Desempeño de la Membrana de Ultrafiltración (5 KDa) .....	40
6.1.3 Desempeño de la Membrana de Ósmosis Inversa .....	46
6.1.4 Sistema Integral de Filtración por Membranas .....	49

6.1.5 Secado por Aspersión del Concentrado de Ósmosis Inversa .....	51
6.1.6 Conclusiones .....	52
6.1.7 Recomendaciones y Perspectivas .....	52
6.2 Sistema de Células en Reposo y en Crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> para la Biotransformación de AF a 4VG .....	53
6.2.1 Biotransformación de AF Puro en un Sistema de Células en Reposo .....	53
6.2.2 Biotransformación de AF con Polvo Reconstituido y Nejayote Clarificado en un Sistema de Células en Crecimiento .....	58
6.2.3 Biotransformación de Nejayote Clarificado, Enriquecido con AF en un Sistema de Células en Crecimiento .....	61
6.2.4 Conclusiones .....	69
6.2.5 Recomendaciones y Perspectivas .....	70
6.3 Sistema de Biocatálisis con Células Completas de <i>B. megaterium</i> para la Descarboxilación de AF .....	70
6.3.1 Descarboxilación del AF en un Sistema de Biocatálisis con Células Completas de <i>Bacillus megaterium</i> .....	70
6.3.2 Selección de Parámetros Óptimos de Temperatura y pH para la Descarboxilación del AF .....	75
6.3.3 Sistema de Biocatálisis Monofásico de Células Completas con AF Puro y Nejayote Enriquecido .....	80
6.3.4 Sistema de Biocatálisis Bifásico de Células Completas con Nejayote Enriquecido .....	82
6.3.5 Producción de 4VG a partir de AF Parcialmente Purificado de Polvo Deshidratado de Nejayote .....	88
6.3.6 Conclusión .....	89
6.3.7 Recomendaciones y Perspectivas .....	89
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>90</b>
<b>8. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>91</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>92</b>

## LISTADO DE FIGURAS

Figura		Página
1	Sistema de filtración por membrana para el tratamiento integral del nejayote.	7
2	Descarboxilación no oxidativa del ácido ferúlico para la producción de 4-vinilguayacol y vainillina.	13
3	Sistema integral de filtración por membranas del nejayote y secado por aspersión.	23
4	Desempeño de la membrana de ultrafiltración de 5 KDa (condiciones de operación,	41
5	Rechazo (%) de la membrana de ultrafiltración.	43
6	Desempeño de la membrana de poliamida en el proceso de ósmosis inversa.	47
7	Balance de materia en el tratamiento del nejayote por un sistema integral de filtración por membrana.	50
8	Cinéticas de biotransformación en un sistema de células en reposo de <i>B. megaterium</i> a concentraciones variables de AF.	54
9	Parámetros cinéticos de biotransformación de AF puro con el sistema de células en reposo de <i>B. megaterium</i> .	57
10	Biotransformación de AF a 4VG con: A) polvo de nejayote reconstituido y B) nejayote clarificado, con una cepa de <i>B. megaterium</i> .	59
11	Cromatoplaqa de TLC de alícuotas de una solución de biotransformación de polvo de nejayote reconstituido,	60
12	Cinéticas de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> en nejayote clarificado enriquecido con AF puro.	61

## LISTADO DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
13	Cinéticas de biotransformación en un sistema de células en crecimiento de <i>B. megaterium</i> con nejayote clarificado.	64
14	Parámetros cinéticos de biotransformación de nejayote enriquecido con AF, con el sistema de células en crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i> .	66
15	Descarboxilación del AF para la producción de 4VG en un sistema biocatálisis de células completas de <i>Bacillus megaterium</i> .	71
16	Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos (AH).	72
17	Actividad descarboxilasa de las células completas de <i>Bacillus megaterium</i> sobre los ácidos hidroxicinámicos (AH).	73
18	Efecto de la temperatura sobre la actividad descarboxilasa del biocatalizador.	76
19	Efecto del pH sobre la actividad descarboxilasa del biocatalizador.	79
20	Parámetros cinéticos de descarboxilación con AF puro y nejayote enriquecido, en un sistema de células en reposo de <i>Bacillus megaterium</i> .	80
21	Estabilidad del biocatalizador en un sistema bifásico.	84
22	Producción y productividad de 4VG del sistema de biocatálisis monofásico (Nejayote) y bifásico (Nejayote: Hexano).	85
23	Descarboxilación del AF en un sistema de biocatálisis bifásico con nejayote enriquecido de 50, 100 y 500 mM de AF.	86

## LISTADO DE TABLAS

Tabla		Página
1	Producción de 4-vinilguayacol por hongos filamentosos, levaduras y bacterias.	14
2	Composición fisicoquímica de nejayote inicial y clarificado obtenido de un proceso de microfiltración.	38
3	Composición fisicoquímica de las fracciones de ultrafiltración (5 KDa) por kg de materia seca.	44
4	Composición fisicoquímica de la alimentación y el concentrado de ósmosis inversa.	48
5	Balance de materia (porcentaje de recuperación) del proceso integral de filtración por membranas.	49
6	Composición fisicoquímica del polvo deshidratado de nejayote.	51
7	Parámetros cinéticos de crecimiento de <i>B. megaterium</i> en nejayote enriquecido.	62
8	Biotransformación del AF a 4VG en sistemas de células viables.	68
9	Comparación en la producción y productividad de 4VG en los sistemas evaluados.	88

## RESÚMEN

El nejayote es un efluente generado durante la nixtamalización, generalmente desechado sin ningún tratamiento pese a contener compuestos de interés industrial, como el ácido ferúlico (AF). El AF es empleado como sustrato para la producción biotecnológica del 4-vinilguayacol (4VG). Recientemente, nuestro grupo de investigación desarrolló un proceso que permite concentrar y purificar parcialmente el AF del nejayote mediante filtración por membranas. En el presente estudio se planteó como hipótesis que la solución concentrada de AF puede ser empleada directamente como sustrato para la biotransformación a 4VG por una cepa de *Bacillus megaterium*, sin que otros compuestos presentes interfieran con el proceso.

En una primera etapa, se generó el material de experimentación a partir del nejayote mediante operaciones de hidrólisis, filtración por membranas y secado por aspersión. En una segunda etapa, se caracterizó la cepa de estudio mediante cinéticas de biotransformación con células en reposo, observando fenómenos de inhibición por producto ( $> 4.6$  mM de 4VG) y por sustrato ( $> 10$  mM AF). Luego se evaluó el proceso de biotransformación en un sistema de células en crecimiento con una solución 5 mM de AF, preparada a partir de nejayote deshidratado. A diferencia del sistema con células en reposo, no se observó la producción de 4VG, debido a una inhibición del sistema atribuible a compuestos fenólicos, diferentes al AF, presentes en una concentración aproximada de 1.1 g/L.

Sin embargo, concentraciones menores de estos compuestos (aprox. 0.74 g/L) permitieron el proceso de biotransformación del AF contenido en nejayote enriquecido (5, 10, 15 y 25 mM AF), obteniendo producciones de 2.11, 2.38, 3.79 y 6.13 mM de 4VG. Los resultados sugieren que el sistema de células en crecimiento con nejayote enriquecido empieza a sufrir inhibición por sustrato a concentraciones  $\geq 15$  mM, mientras que una concentración de 6 mM de 4VG ocasiona una inhibición por producto. Estos resultados demuestran que

compuestos fenólicos diferentes al AF afectan el proceso de biotransformación, pudiendo inhibir la producción de 4VG.

En una tercer etapa, se evaluaron sistema de biocatálisis (monofásico y bifásico) con células completas (no viables) de *Bacillus megaterium*. Con el sistema monofásico se obtuvo una producción de 13.8 mM de 4VG a partir de 25 mM de AF, mientras que con el sistema bifásico, se obtuvo una producción de 62 mM de 4VG a partir de 100 mM de AF. Los resultados obtenidos demuestran que el sistema de biocatálisis bifásico resultó el más eficiente para reducir la inhibición por 4VG.

**Palabras clave:** *nejayote, ácido ferúlico, 4-vinilguayacol, biotransformación, biocatálisis, Bacillus megaterium.*

## ABSTRACT

Nejayote is a pollutant liquid effluent generated during nixtamalization process, usually disposed without any treatment despite contains high value compounds, such as ferulic acid (FA). FA is widely used as substrate for the biotechnological production of 4-vinylguaiacol (4VG). Recently, our research group developed that allows concentrating and partially purifying FA from nejayote by membrane filtration. In the current study, it was hypothesized that the concentrated solution can be used directly as a substrate for the biotransformation to 4VG by a *Bacillus megaterium* strain, without other compounds interfering with the process.

In a first stage, the experimental material was generated from nejayote by hydrolysis, membrane filtration and spray drying operations. In a second stage, the strain was characterized by biotransformation kinetics with resting cells, observing a product (> 4.6 mM 4VG) and substrate (> 10 mM AF) inhibition. Then, the biotransformation process was evaluated in a growing cells system with a 5 mM solution of FA, prepared from dehydrated nejayote powder. In contrast to resting cells system, 4VG production was not observed due to a system inhibition attributed to phenolic compounds, different than FA, present at an approximately concentration of 1.1 g/L.

However, lower concentration of these phenolic compounds (approx. 0.74 g/L) allowed the FA biotransformation content in enriched nejayote (5, 10, 15 and 25 mM of FA), achieving a production of 2.11, 2.38, 3.79 and 6.13 mM of 4VG. The results suggest that the growing cell system with enriched nejayote was inhibited by a substrate concentration  $\geq 15$  mM of FA, while a concentration of 6 mM of 4VG causes a product inhibition. These results demonstrate the phenolic compounds different from FA, affect the biotransformation process, which can inhibit the 4VG production.

In a third stage, a biocatalyst system was evaluated (monophasic and biphasic) with *Bacillus megaterium* whole-cells (non-viable). With a monophasic system, a production of 13.8 mM of 4VG was achieved from 25 mM of FA, whereas with

the biphasic system, a production of 62 mM of 4VG was obtained from 100 mM of FA. The results obtained demonstrate that the biphasic system was the most efficient to reduce the 4VG inhibition.

**Keywords:** *nejayote, ferulic acid, 4-vinylguaiacol, biotransformation, biocatalysis, Bacillus megaterium.*

## I. INTRODUCCIÓN

La nixtamalización es el proceso mediante el cual los granos del maíz son sometidos a una hidrólisis alcalina y térmica para la elaboración de la masa nixtamalizada (Paredes-López et al., 2009). Durante el proceso de nixtamalización se genera un efluente líquido, conocido comúnmente como nejayote, que es considerado un residuo altamente contaminante por su contenido elevado en materia orgánica (residuos de pericarpio de maíz, polisacáridos no amiláceos, almidón y compuestos fenólicos) e inorgánica (sales de calcio). Estos compuestos generan una alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) alrededor de 7,000 a 14,000 mg O<sub>2</sub>/ L (Rosentrater et al., 1999, (Gutiérrez-Uribe et al., 2010).

En México, son desechados al sistema de drenaje alrededor de 1.2 millones de m<sup>3</sup> de nejayote/ día sin tratamiento previo (Valderrama-Bravo et al., 2012), como una contribución ante el impacto ambiental que representa este líquido contaminante, nuestro grupo de investigación desarrolló un proceso que, mediante tecnología enzimática y de membranas, permite purificar de manera parcial y concentrar compuestos de alto valor y que además contribuyen a las elevadas DBO, tal es el caso de los arabinoxilanos y el AF (Asaff y Reyes, 2013). La purificación exhaustiva de los arabinoxilanos y el AF, permite su comercialización directa en el ramo industrial para su empleo en diversas aplicaciones. Por ejemplo, el AF de alta pureza es ampliamente utilizado en la industria de los alimentos como precursor en la síntesis química de saborizantes, como el 4VG (Kumar y Pruthi, 2014).

Sin embargo, la creciente exigencia de las legislaciones americanas y europeas en materia de regulación de saborizantes, ha conllevado a limitar e inclusive prohibir los productos obtenidos por síntesis química para el consumo humano (Bicas et al., 2010).

Los procesos biotecnológicos son una alternativa en la producción de 4VG con denominación como producto natural, incrementando su interés comercial en el mercado. Sin embargo, los costos asociados a la producción del 4VG son elevados, lo cual limita el mercado mundial.

Con el fin de abaratar la producción de productos naturales mediante procesos biotecnológicos, en los últimos años han sido empleados residuos agroindustriales en la producción biotecnológica de compuestos aromáticos. Por su contenido en ácido ferúlico, el concentrado de nejayote que es obtenido del proceso de filtración por membranas (Asaff y Reyes 2013) es un potencial precursor económico para la producción biotecnológica de 4VG.

Además, recientemente en nuestro grupo de investigación se aisló del nejayote una nueva cepa bacteriana capaz de producir 4VG, la cual fue identificada por técnicas moleculares por homología de la región 16 S ribosomal que permitió identificarla como *Bacillus megaterium*. Ya que nejayote es el nicho biológico de esta cepa, se desconoce el efecto de la presencia de compuestos diferentes al ácido ferúlico que se encuentran de manera natural en el nejayote y el efecto sobre la eficiencia que pudiera mostrar en la biotransformación *Bacillus megaterium*.

En este estudio se planteó evaluar la eficiencia de biotransformación del ácido ferúlico contenido en un concentrado de nejayote obtenido de un sistema integral de filtración por membranas, a 4VG y compararlo con la eficiencia obtenida empleando soluciones de AF puro. Además, se exploraron 4 sistemas de biotransformación del AF con las células de *Bacillus megaterium* con el objetivo de seleccionar un sistema adecuado para la producción de 4VG.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 El Nejayote: Efluente Contaminante Generado en la Nixtamalización del Maíz

El maíz es la principal fuente de alimentación en México y el resto de los países de América Latina, en fechas recientes los productos derivados de la tortilla han ingresado en el mercado de Estados Unidos, Asia y Europa (Córtez-Gómez et al., 2005). La materia prima para la elaboración de estos productos es la masa nixtamalizada de maíz. En el proceso de nixtamalización, los granos de maíz son cocidos a temperaturas superiores a los 70 °C en una solución acuosa con hidróxido de calcio y/o carbonato de calcio a una concentración del 1% (p/v), durante 60 minutos (Paredes-López et al., 2009).

La hidrólisis térmica y alcalina a la que son sometidos los granos de maíz, genera una modificación en la estructura del grano, ocasionando la liberación del pericarpio (Rojas-Molina et al., 2007). Posteriormente, el grano se deja remojar durante 12 horas en el agua de cocimiento, con el objetivo de ablandar el grano sin el pericarpio (Sefa-Dedeh et al., 2004). Finalmente, en el proceso de nixtamalización se obtienen dos corrientes; 1) Los granos cocidos o nixtamal, los cuales son molidos para la elaboración de la masa nixtamalizada y 2) El agua de cocimiento alcalina, denominado comúnmente como nejayote (Rosentrater, 2006)

El nejayote es desechado en el sistema de alcantarillado urbano y contiene materia orgánica e inorgánica (remanentes de sales de calcio) (Gutiérrez-Urbe et al., 2010). La composición de este efluente es de aproximadamente 2-7% de sólidos totales, en donde, el material orgánico está constituido por un 50% de sólidos en suspensión, de los cuales el 64% son polisacáridos no amiláceos (arabinosilanos), 20% almidón y 1.4% proteína (Serna-Saldivar et al., 1990). El otro 50% de la materia orgánica está constituido por sólidos en solución tales como proteínas, azúcares, vitaminas y fitoquímicos ricos en compuestos fenólicos y carotenoides (Pflugfelder et al., 1988).

El alto contenido de la materia orgánica e inorgánica en el nejayote generan elevadas demandas bioquímicas de oxígeno (DBO) de 7,000 a 14,000 mg O<sub>2</sub>/ L, motivo por el cual es considerado un efluente altamente contaminante. Contradictoriamente, son limitados los métodos que permiten el tratamiento adecuado de nejayote, por lo que en México son desechados al drenaje alrededor de 1.2 millones de m<sup>3</sup> de nejayote/ día sin tratamiento previo (Valderrama-Bravo et al., 2012), pese a que las normas ambientales señalan un límite máximo de descarga para residuos agroindustriales de 200 mg O<sub>2</sub>/ L (NOM-001-SEMARNAT-1996; NOM-002-ECOL 1996).

Debido a las legislaciones ambientales cada vez más exigentes en materia de disposición de efluentes agroindustriales, se han buscado procesos unitarios que permitan la separación de la materia orgánica del nejayote para disminuir la DBO (Reyes-Vidal et al., 2012). Sin embargo, la implementación de procesos de centrifugación, sedimentación y floculación han sido poco exitosos debido al contenido elevado de sólidos en suspensión en el nejayote (Viniegra-González y Ramírez-Romero, 2007).

Como alternativa, el desarrollo tecnológico de nuevos sistemas de filtración por membranas han permitido el tratamiento integral de los residuos agroindustriales como el nejayote (Chang y Kim, 2005). Además, de reducir el contenido de materia orgánica, los sistemas de filtración por membrana desempeñan un rol importante en la recuperación y purificación parcial de

compuestos de alto valor agregado como polisacáridos no amiláceos y compuestos fenólicos, causantes de las elevadas demandas bioquímicas de oxígeno del nejayote (Reis y Zydney, 2007).

## 2.2 Tratamiento Integral del Nejayote con un Sistema de Filtración por Membranas

El transporte de una mezcla heterogénea de compuestos a través de una membrana esta mediado por fuerzas impulsoras como la diferencia de presión y el corte efectivo del peso molecular de la membrana (MWCO, por sus siglas en inglés) (De Jong et al., 2006). De acuerdo a lo anterior, los procesos de filtración se pueden agrupar en cuatro categorías de acuerdo al tamaño de partícula que permiten separar: microfiltración ( $> 5000$  Da), ultrafiltración (1000-5000 Da), nanofiltración (100-1000 Da) y ósmosis inversa ( $<100$  Da) (Nicolaisen, 2002). Para la recuperación de compuestos de alto valor industrial, el flujo de alimentación se hace pasar a través de una membrana con un MWCO específico y a una presión intermembrana determinada. Las corrientes resultantes es el permeado, que contiene moléculas de un peso molecular menor al especificado de la membrana y el rechazo que posee moléculas de mayor peso molecular que no lograron a travesar la membrana (Baker, 2012).

En el sistema desarrollado por Asaff y Reyes (2013), el nejayote es sometido a un tratamiento previo que permite la remoción efectiva del material en suspensión que puede afectar el rendimiento del sistema de filtración por membranas. Este tratamiento previo involucra la neutralización del nejayote, posteriormente se realiza la hidrólisis enzimática de las moléculas de almidón, seguido de una etapa de floculación y finalmente la epata de sedimentación para remover los floculos.

El proceso de sedimentación no garantiza una completa remoción de los floculos, por tal motivo, el nejayote es sometido a un proceso de microfiltración para el remanente de floculos. Una vez libre de sólidos, el nejayote es sometido

a una ultrafiltración, obteniendo una fracción de rechazo rico en arabinosilanos de cadena larga, los cuales pueden ser concentrados hasta 20 veces implementando procesos de diafiltración que consisten en recircular la fracción de rechazo por la membrana de ultrafiltración.

El permeado obtenido de la ultrafiltración se hace pasar a través de una membrana de nanofiltración con MWCO de 1 KDa, con el objetivo de recuperar oligómeros de arabinosa y xilosa, y compuestos fenólicos como el ácido ferúlico. La implementación de un sistema de ósmosis inversa, permite concentrar el contenido de pentosas y AF, y obtener agua que puede ser reutilizada en el proceso de nixtamalización o en el lavado de las membranas (Figura 1)

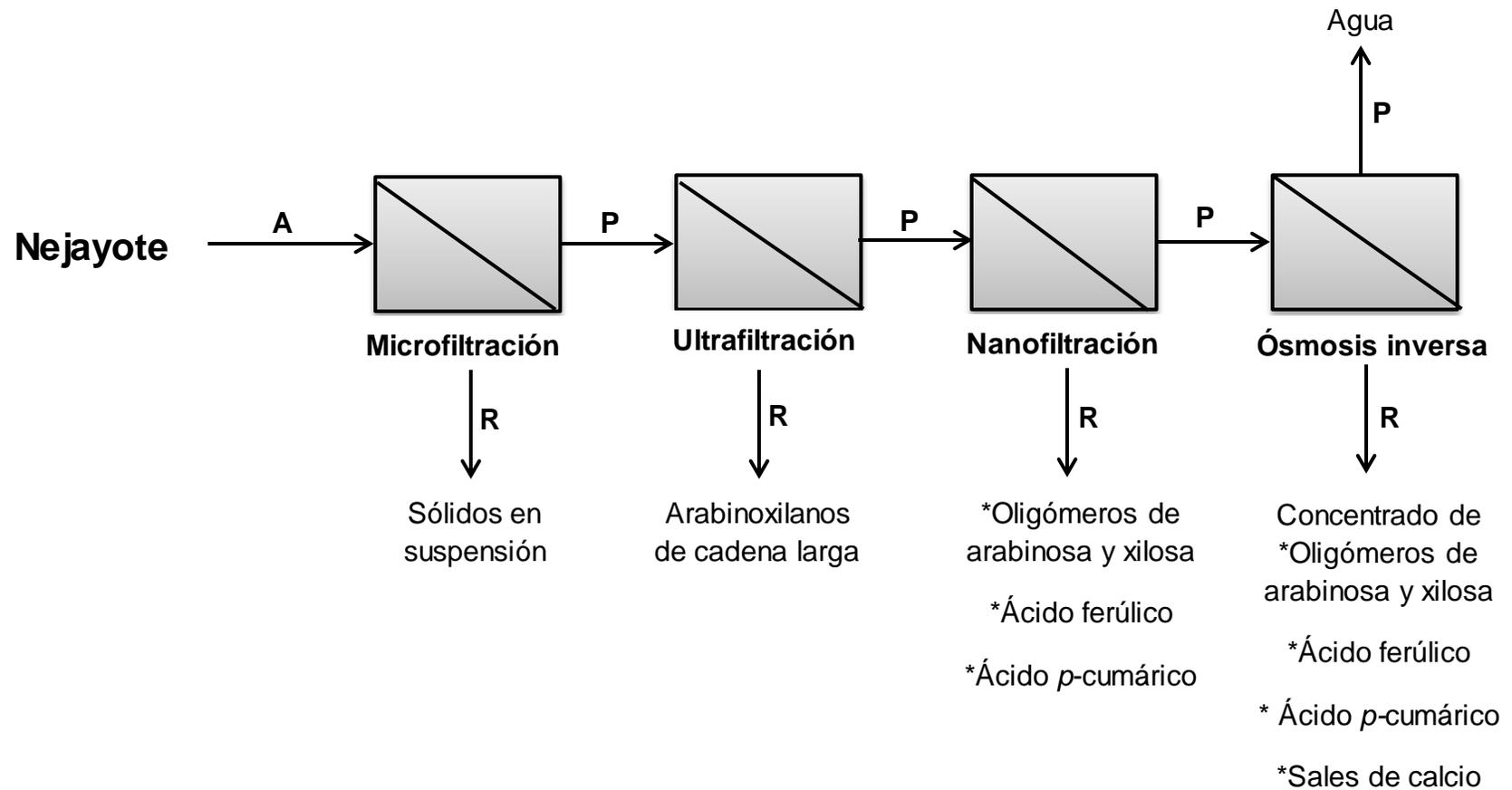


Figura 1. Sistema de filtración por membrana para el tratamiento integral del nejayote propuesto por Asaff y Reyes (2013). En donde A= alimentación del sistema, R= fracción de rechazo o retenido y P= Fracción de permeado.

### 2.3 Compuestos de Alto Valor Contenidos en el Nejayote y su Aplicación Industrial

Los compuestos de alto valor contenidos en las fracciones concentradas de rechazo, pueden ser adicionalmente purificados para su posterior venta directa al sector industrial, tal y como lo reportan Carvajal-Millán et al. (2005), que establecieron un proceso que permite la extracción y purificación de arabinoxilanos ferulados de cadena larga mediante la adición de etanol.

Los arabinoxilanos tienen la capacidad de formar geles covalentes mediante el entrecruzamiento de moléculas de ácido ferúlico unidos en la posición O5 de los residuos de arabinosa (Carvajal-Millán et al., 2005). Esta propiedad de formación de geles, permite emplear a los arabinoxilanos como matrices para la liberación controlada de biomoléculas en el colón (Berlanga-Reyes et al., 2009). La recuperación de arabinoxilanos a partir de residuos agroindustriales ha cobrado una mayor importancia debido a su potencial aplicación en la industria alimentaria como prebióticos y antioxidantes (Niño-Medina et al., 2010).

Además de los arabinoxilanos, también se pueden recuperar compuestos fenólicos contenidos en las fracciones concentradas de nejayote mediante adsorción-desorción con resinas específicas (Asaff et al. (2008) En el proceso descrito se reporta que por cada m<sup>3</sup> de nejayote se obtienen aproximadamente 2 kg de concentrado de compuestos fenólicos, en donde el 25% representa el AF y el 75% otros compuestos fenólicos. La purificación exhaustiva del AF permite su comercialización directa en el sector industrial a un precio aproximado de entre \$60 a \$80 dólares por kilogramo (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, USA).

El ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) es un ácido hidroxicinámico que es componente biológico y estructural de la pared celular vegetal y se puede encontrar de forma libre, como homodímeros o esterificado con polisacáridos lignocelulosicos de la pared celular (Harris y Trethewey 2010). La extracción del AF a partir de fuentes naturales resulta comercialmente

importante debido a sus múltiples aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Kumar y Pruthi, 2014).

Al igual que otros compuestos fenólicos, el AF presenta una actividad antioxidante en respuesta a los radicales libres mediante la donación de un protón del grupo funcional hidroxilo (Kikuzaki et al., 2002). Debido a esta propiedad, el AF reduce la sobreproducción de radicales libres en el páncreas generado por trastornos endocrinos como la diabetes (Balasubashini et al., 2004). Además, el AF ha mostrado propiedades anticancerígenas, inhibiendo el crecimiento de células cancerígenas de mama, colon y gastrointestinales (Logt et al., 2003; Menéndez et al., 2008). Estudios recientes demostraron que el AF tiene un gran potencial para la inhibición de enzimas involucradas en la apoptosis celular, por lo cual se ha planteado su empleo en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer (Sgarbossa et al., 2015).

En la industria cosmética, el AF junto con la vitamina A y E son empleados en la formulación de bloqueadores solares como compuestos activos para proteger contra la radiación UV (Murray et al., 2008). En cremas blanqueadores, se ha reportado que el AF inhibe la sobreproducción de melanina mediante un mecanismo de inhibición competitiva de la tirosina, que es precursor de la melanina (Saija et al., 2000).

Mientras que en la industria alimentaria, el AF ha mostrado un gran potencial como agente antimicrobiano al inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Además de reducir hasta un 70% la formación de biopelículas de estas bacterias patógenas con una concentración de 1 g/L de AF (Borges et al., 2012).

Sin embargo, la aplicación de mayor importancia comercial del AF es como precursor en la síntesis de aromas de alto valor agregado, como la vainillina y el 4VG (Kaur y Chakraborty 2013). La vainillina es el compuesto aromático mayoritario que aporta el sabor y aroma a vainilla, y es el saborizante más empleado en la industria alimentaria (Converti et al., 2010). La vainillina

sintética tiene un precio de venta entre \$13 a \$24 dólares por kilogramo, mientras que la biotecnológica se comercializa a un precio de \$100 a \$200 dólares por kilogramo (da Silva et al., 2009).

Por otro lado, el 4VG tiene un precio de venta hasta 40 veces superior al del AF (Mathew et al., 2007), por lo que la recuperación y purificación del AF a partir de fuentes naturales e inclusive de residuos agroindustriales como el nejayote, para la producción de vainillina y 4VG resulta comercialmente atractivo.

## 2.4 Métodos de Producción del 4-vinilguayacol

### 2.4.1 El 4-vinilguayacol y sus Aplicaciones Industriales

El 4-vinilguayacol (2-metoxi-4-vinilfenol) es un compuesto fenólico perteneciente a los hidroxiestirenos o 4-vinilos, que contribuyen en el sabor y aroma deseables en diversos productos alimentarios. El aroma a clavo característico del 4VG proporciona características organolépticas deseables en cervezas de trigo estilo belga y cervezas alemanas Rauchbier (cerveza ahumada), como también en la salsa de soya (Matthew y Abraham, 2006; Langos et al., 2013). Se ha demostrado que el 4VG presenta una capacidad antioxidante similar al  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) (Fujioka y Shibamoto, 2006), por lo cual su empleo en la industria farmacéutica tiene un gran potencial como agente antiproliferativo para reducir la carcinogénesis (Jeong y Jeong, 2010), también se ha empleado como agente bioactivo en la elaboración de soluciones oftalmológicas, como agente antiespumante (Salomone y Xia, 2006). La producción de aromas y sabores, como el 4VG, representan aproximadamente el 25% del mercado mundial de los aditivos alimentarios y generalmente son producidos mediante síntesis química.

### **2.4.2 Síntesis Química del 4-vinilguayacol**

Los compuestos aromáticos derivados de los hidroxiestierenos son producidos por diversos procesos de síntesis química: 1) deshidrogenación del etilbenceno, 2) cloración del etilbenceno seguido de la eliminación del haluro de hidrógeno, 3) condensación entre el 4-hidroxibenzaldehído y el ácido malónico, seguido de una descarboxilación térmica (reacción de Knoevenagel–Doebner), y 4) descarboxilación térmica del ácido ferúlico bajo irradiación por microondas (Nomura et al., 2005; Simpson et al., 2005; Sinha et al., 2007). Estos procesos químicos involucran como catalizadores compuestos tóxicos como sales metálicas y quinoleínas, y su presencia en el producto final puede ocasionar daños en la salud humana y en el medio ambiente. Además, los reactivos para llevar a cabo estos procesos tienen un costo elevado de adquisición, obteniendo al final un rendimiento solo del 30% al 40% (Bernini et al., 2007).

Por tal motivo, los productos elaborados con sabores y aromas producidos mediante síntesis química, son etiquetados como artificiales de acuerdo a las legislaciones americanas (US Code of Federal Regulations 21 CFR 101.22) y europeas (Council Directive 88/388/EEC), lo que ocasiona una disminución del interés comercial y económico. Esto debido a que en las últimas décadas, se ha observado una tendencia mundial de los consumidores a seleccionar productos considerados como ecológicamente seguros y saludables, los cuales están asociados a los productos naturales.

### **2.4.3 Producción Biotecnológica del 4-vinilguayacol**

Los aromas y sabores se producen mediante procesos biotecnológicos, como una alternativa a los que se obtienen a partir de síntesis química. Los procesos biotecnológicos ofrecen diversas ventajas como condiciones suaves de reacción, alta especificidad por el sustrato y la nula generación de residuos contaminantes en el medio ambiente (Bicas et al., 2010), además que tienen la

denominación de producto natural. Debido a que la legislación americana y europea en cuestión de aditivos alimentarios, establecen que los aromas producidos por vía biotecnológica pueden ser denominados como naturales, lo que ha incrementado el interés comercial de los consumidores a adquirir productos que contengan aromas y sabores elaborados por procesos biotecnológicos (Dal Bello, 2013).

La producción biotecnológica del 4VG es llevada a cabo por la biotransformación del AF, la alta pureza que es empleado como sustrato ya tiene un valor comercial importante, motivo por el cual el costo de producción del 4VG es elevado (Mishra et al., 2014). Por lo tanto, para que el desarrollo de procesos biotecnológicos sean competitivos en el mercado, se ha buscado la disminución del costo de producción del 4VG mediante la selección de materia prima económica y la selección de sistemas de biotransformación adecuados.

## 2.5 Biotransformación del Ácido Ferúlico a 4-vinilguayacol

### **2.5.1 Descarboxilación no Oxidativa del Ácido Ferúlico**

Los procesos de biotransformación están definidos como la transformación química de un sustrato específico a un producto esperado, llevado a cabo por la acción enzimática de los microorganismos (Gounaris, 2010). El AF puede ser biotransformado por los microorganismos mediante cuatro rutas diferentes: 1) reducción de la cadena lateral, 2) desacetilación dependiente de CoA, 3) desacetilación independiente de CoA, y 4) descarboxilación no oxidativa (Mathew y Abraham, 2006).

La enzima descarboxilasa del ácido ferúlico cataliza la descarboxilación no oxidativa de la cadena lateral propenoide del AF, para la producción del 4VG (Figura 2) (Gallager y Møller, 2015). Posteriormente, el 4VG puede ser biotransformado a vainillina mediante la 4-vinilguayacol oxigenasa (Furuya et al., 2015).

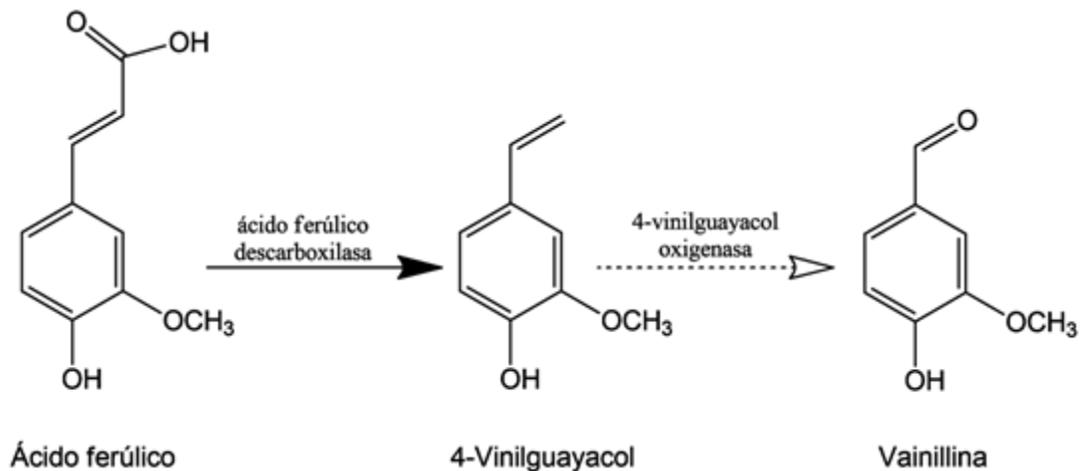


Figura 2. Descarboxilación no oxidativa del ácido ferúlico para la producción de 4-vinilguayacol y vainillina.

La ácido ferúlico descarboxilasa es una enzima intracelular que no requiere de cofactores, lo que disminuye el costo del proceso biotecnológico por lo que es de gran interés para la producción industrial del 4VG. Este mecanismo se ha observado en diversos hongos, levaduras y bacterias por lo que han sido evaluados para la producción de 4VG (Tabla 1).

Se ha reportado que el proceso de descarboxilación del AF es un mecanismo en el que los microorganismos reducen la toxicidad del medio en el que se encuentran, y lo hacen mediante la transformación a otros compuestos fenólicos de baja toxicidad (Seshime et al., 2005). A pesar de la capacidad de las células para realizar el proceso de detoxificación, se ha observado que el metabolismo de los microorganismos se ve inhibido a concentraciones

superiores a 1 g/L de AF (Sikkema et al., 1995). Por tal motivo, la concentración inicial de AF evaluado en los estudios realizados con anterioridad, no superan los 2 g/L, observando en su mayoría una baja producción de 4VG en tiempos superiores a las 12 horas de cultivo.

Con base en lo anterior, con el fin de obtener una mayor producción biotecnológica de 4VG y que ésta sea competitiva con los procesos industriales de síntesis química, es necesaria la búsqueda y el aislamiento de nuevos microorganismos, preferentemente a partir de fuentes naturales que contengan AF, con el fin de que estos tengan una mayor tolerancia a los compuestos fenólicos y exista la posibilidad de incrementar la producción de 4VG (Peng et al., 2003).

Tabla 1. Producción de 4-vinilguayacol por hongos filamentosos, levaduras y bacterias.

<b>Microorganismo</b>	<b>AF (g/L)</b>	<b>4VG (g/L)</b>	<b>Tiempo (horas)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bacillus coagulans</i>	1	0.9	7	Karmakar et al., (2000)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	2	1.5	10	Mathew et al., (2006)
<i>Enterobacter sp.</i> Px6-4	1	0.4	12	Li et al., (2008)
<i>Aspergillus niger</i> DAR2	0.8	0.2	120	Baqueiro-Peña et al., (2010)
<i>Lactobacillus farciminis</i>	0.05	0.01	48	Adamu et al., (2012)
<i>Streptomyces setonii</i>	1	0.9	12	Máx et al., (2012)
<i>Bacillus cereus</i> SAS-3006	0.5	0.08	125	Mishra et al., (2014)

### **2.5.2 *Bacillus megaterium* Aislado de Nejayote: una Nueva Cepa para la Descarboxilación del Ácido Ferúlico**

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* han sido aisladas de diversos entornos y se ha demostrado su capacidad de producción de diversos metabolitos de interés industrial (Peng et al., 2003). Recientemente, nuestro grupo de investigación aisló una bacteria a partir del nejayote, capaz de metabolizar diversas fuentes de carbohidratos como fructosa, glucosa, manitol y xilosa. De acuerdo al análisis de homología de la región 16S ribosomal e ITS la cepa aislada mostró un 99% de similitud con *Bacillus megaterium* en ambos análisis.

*Bacillus megaterium* es una bacteria Gram positiva con capacidad de formación de esporas, que ha sido empleada como modelo en el estudio de la estructura de la membrana celular, la esporulación y en la localización y función de proteínas microbianas (Eppinger et al., 2011). En el campo de la biotecnología industrial, *Bacillus megaterium* ha sido empleada en la producción de enzimas como amilasas, proteasas, xilanasas y penicilina G acilasa, y también en la síntesis de metabolitos de interés como L-aminoácidos, vitamina B12 y polihidroxibutirato (PHB) (Korneli et al., 2013).

La implementación de un estudio preliminar permitió demostrar que la cepa es capaz de biotransformar el AF contenido en el nejayote a 4VG, catalizado por una descarboxilasa intracelular. Por lo que se infiere, que las células de *Bacillus megaterium* pueden ser empleadas como un agente potencial de biotransformación para la producción de 4VG bajo los sistemas de células en crecimiento, en reposo o completas.

### **2.5.3 Sistemas de Biotransformación: Células en Crecimiento y Células en Reposo**

La biotransformación con células en crecimiento se realizan en medios nutritivos que contienen las fuentes de carbono y nitrógeno necesarios para el crecimiento de los microorganismos, además del sustrato específico, tal es el caso del AF para llevar a cabo su biotransformación. La fuente de carbono y el sustrato (AF) son ingresados a la célula microbiana mediante un sistema de transporte específico, en el que las células pueden emplear el AF como fuente de carbono para la generación de biomasa y producto (4VG) (Alcón, 2003). La biotransformación con células en crecimiento implica la formación de diversos subproductos asociados al metabolismo celular, lo cual dificulta el proceso de recuperación del metabolito deseado (4VG) (Faber, 2011).

Por el contrario, el sistema de biotransformación con células en reposo está definido por células en estado de latencia, donde no se presenta crecimiento celular pero son metabólicamente viables para llevar a cabo procesos de biotransformación (Julsing et al., 2012). Estos procesos son llevados a cabo en soluciones acuosas en donde solo está contenido el sustrato específico (AF). La generación de biomasa es limitada por la ausencia de fuentes de carbono y nitrógeno, favoreciendo un estado estacionario del crecimiento microbiano. Por lo que, la producción de subproductos asociados al metabolismo es baja, permitiendo a su vez una mayor facilidad en la recuperación y purificación del metabolito deseado (Faber, 2011).

Cabe destacar que la eficiencia de ambos sistemas de biotransformación descritos está limitada por el crecimiento y viabilidad de las células. Alagappan y Cowan (2001), tomando como referencia el modelo de inhibición propuesto por Wayman y Tseng (1976), reportaron que la viabilidad de las células microbianas se ve comprometida por: 1) la adición de inhibidores del metabolismo, como compuestos fenólicos, cloro, alcohol y antibióticos, 2) el incremento en la concentración inicial del sustrato (inhibición por sustrato) y 3) la acumulación del producto en el sistema de biotransformación (inhibición por

producto). Para incrementar la selectividad y reducir la inhibición por sustrato y producto en los sistemas de biotransformación con células viables, se han implementado procesos de biocatálisis con células completas sin viabilidad.

#### **2.5.4 Sistema de Biocatálisis: Células Completas**

Los sistemas de biocatálisis son ampliamente utilizados en el desarrollo de procesos industriales para la producción de moléculas de alto valor, en donde se emplea como biocatalizador enzimas purificadas o células completas sin viabilidad (Schmid et al., 2001). No obstante, la purificación de la enzima de interés incrementa drásticamente los costos de producción del proceso y estas son menos estables en comparación a los biocatalizadores de célula completa (Ishige et al., 2005), por tal motivo, solamente el 7% de los estudios de biocatálisis son realizados con enzimas purificadas, siendo el resto llevados a cabo con los sistemas de células completas (De Carvalho y Da Fonseca, 2007).

El uso de las células de microorganismos como biocatalizadores, define a la célula como unidad catalítica para la síntesis, en donde la enzima de interés se encuentra “inmovilizada” en el interior de la célula. Sin embargo, las células completas presentan una estructura y funcionalidad más compleja en comparación a los procesos tradicionales de catálisis heterogénea y homogénea (Schrewe et al., 2013).

La complejidad en el sistema de células completas está relacionada con la presencia de las membranas lipídicas de las células, ya por un lado, la membrana regula el transporte de compuestos del exterior al interior de la célula, ofreciendo una protección contra compuestos tóxicos y por otro lado, la membrana limita la transferencia de masa del sustrato hacia el interior de la célula y la salida del producto de la unidad catalítica. Por tal motivo, la eficiencia del sistema de biocatálisis depende de la transferencia de masa en ambas

direcciones y de la acumulación transitoria de las moléculas de interés en el citoplasma celular (Sikkema et al., 1995; Park et al., 2006).

Las moléculas hidrofóbicas de bajo peso molecular como el AF y el 4VG atraviesan la membrana por difusión mediante un gradiente de concentración como fuerza impulsora. Sin embargo, su acumulación en el citoplasma puede ocasionar una inhibición tanto por sustrato como por producto en el biocatalizador, disminuyendo la eficiencia del sistema de biocatálisis. Como alternativa, se han implementado sistemas bifásicos con un solvente orgánico inmiscible con la fase acuosa, en el que la biocatálisis ocurre en la fase acuosa y el producto generado particiona hacia la fase orgánica, lo que permite incrementar la transferencia de masa en el sistema y a su vez reducir los efectos inhibitorios del sustrato y el producto (Klibanov, 2001).

A pesar de las ventajas que ofrecen los sistemas de biocatálisis bifásicos, algunos solventes orgánicos desestabilizan los enlaces electrostáticos, hidrofóbicos y puentes de hidrógeno que conllevan a la desnaturalización de la proteína (Doukyu y Ogino 2010). Los criterios más importantes para la selección de un solvente adecuado en el proceso de biocatálisis bifásico con células completas, se describen a continuación.

1.- Los solventes polares producen un mayor cambio conformacional en la estructura terciaria de las enzimas en comparación a los solventes no polares, provocando una pérdida de la actividad enzimática (Serdakowski y Dordick 2008).

2.- El coeficiente de partición (P) del sustrato y del producto hacia el solvente en el sistema bifásico. El coeficiente de partición es comúnmente definido como la relación de las concentraciones de un compuesto en una mezcla inmiscible de un solvente orgánico y una solución acuosa ( $P = [C]_{\text{sol. orgánico}} / [C]_{\text{acuosa}}$ ). Entre mayor sea el valor de P, mayor será el grado de hidrofobicidad del compuesto y su partición hacia el solvente orgánico (Lee y Lee 2008).

3.- El sistema de biocatálisis bifásico debe estar acoplado eficientemente a los procesos de recuperación del producto de interés (Downstream processing). En procesos industriales se ha buscado la selección de solventes que posean una temperatura de ebullición mucho menor a la del agua, para permitir recuperar y concentrar el producto mediante procesos de evaporación (Schrewe et al., 2013).

## 2.6 Concentrado de Nejayote como Precursor para la Producción Biotecnológica de 4-vinilguayacol

Como se mencionó, los sabores y aromas son elaborados generalmente mediante procesos de síntesis química comercializados en el mercado a bajo costo, en comparación con los productos biotecnológicos. El costo global de operación puede estar asociado a los costos de adquisición de la materia prima, los costos de producción (biotransformación ó biocatálisis) y los costos de recuperación y purificación del producto deseado (Downstream processing). En términos generales, el costo de adquisición de la materia prima representa entre el 20% al 30% del costo global de operación, una materia prima o precursor económico permitiría disminuir el costo total de producción (Ignant et al., 2010).

Como alternativa, en los últimos años se han empleado residuos agroindustriales en la producción de moléculas de alto valor agregado. Por su contenido en AF, el concentrado de nejayote obtenido a partir del proceso de filtración (Asaff y Reyes, 2013), representa un sustrato potencial para la producción biotecnológica de 4VG. Sin embargo, el concentrado de nejayote contiene otros compuestos fenólicos y no fenólicos diferentes al AF de los cuales se desconoce su efecto sobre el proceso de biotransformación en 4VG llevado a cabo por la cepa de *Bacillus megaterium*.

### **III. HIPÓTESIS**

El ácido ferúlico contenido junto con otras moléculas en un concentrado de nejayote puede ser biotransformado en 4-vinilguayacol con la misma eficiencia de procesos de biotransformación que emplean soluciones de ácido ferúlico puro.

## IV-. OBJETIVOS

### 4.1-. Objetivo General

Comparar la eficiencia de biotransformación del ácido ferúlico contenido en un concentrado de nejayote a 4-vinilguayacol con la eficiencia obtenida empleando soluciones de ácido ferúlico puro.

### 4.2.- Objetivos Específicos

1. Generar el material de experimentación a partir del nejayote mediante la implementación de un sistema de nanofiltración/ósmosis inversa y caracterizarlo fisicoquímicamente.
2. Determinar los parámetros cinéticos de la biotransformación de la solución concentrada de ácido ferúlico obtenida a partir del nejayote para la producción de 4-vinilguayacol.
3. Determinar los parámetros cinéticos de la biotransformación de una solución de ácido ferúlico puro a 4-vinilguayacol por *Bacillus megaterium*.
4. Seleccionar un sistema adecuado para la producción biotecnológica de 4-vinilguayacol.

## **V.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Valorización de un Efluente Líquido de la Industria del Nixtamal (Nejayote) Mediante un Sistema Integral de Membranas y Secado por Aspersion**

#### **5.1.1 Obtención y Acondicionamiento de la Muestra**

Las muestras de 120 L de nejayote fueron provistas por la tortillería Tulipanes, ubicada en el municipio de Zapopan, Jalisco. El acondicionamiento del nejayote y la filtración por membranas del material acondicionado se realizó mediante el procedimiento descrito en la solicitud de patente Mx/2013/002096 (Asaff y Reyes, 2013). Para el pretratamiento de la muestra se realizaron los siguientes pasos: a) neutralización del nejayote con ácido sulfúrico concentrado (98% v/v), b) hidrólisis enzimática del material amiláceo, c) floculación de sólidos en suspensión mediante poliacrilamida catiónica, d) eliminación de flóculos por sedimentación. Luego, el nejayote pretratado fue filtrado a través de un sistema de membranas de microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa de acuerdo al diagrama expuesto en la Figura 3.

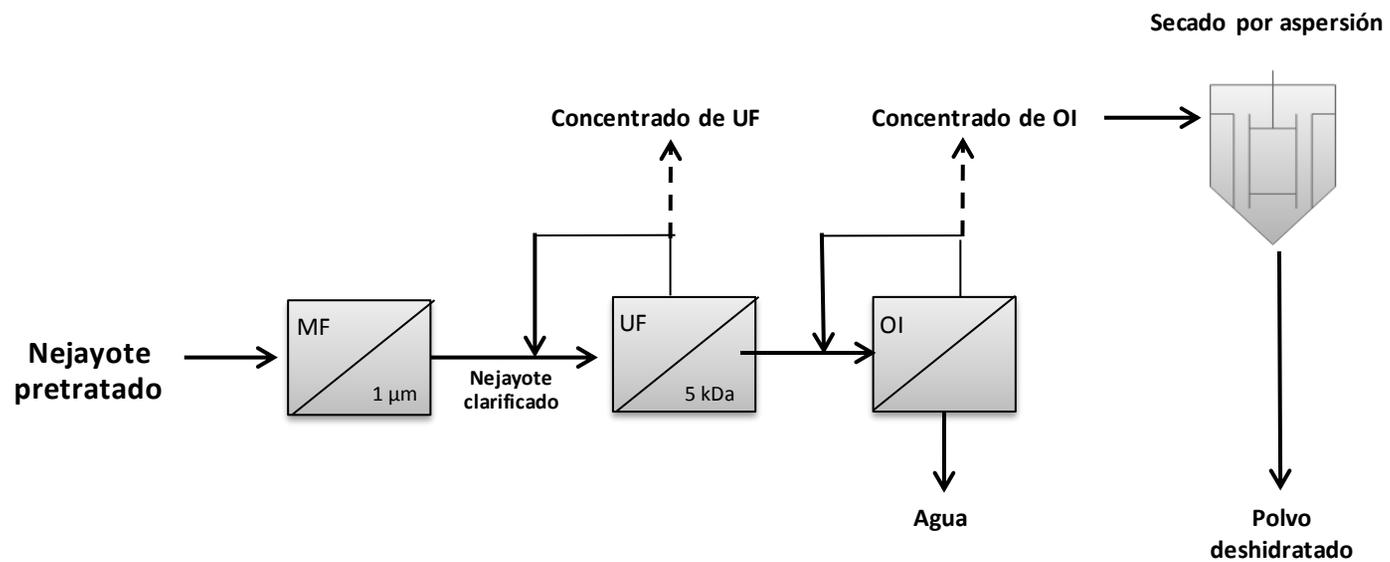


Figura 3. Sistema integral de filtración por membranas del nejayote y secado por aspersion. En donde MF = microfiltración; UF = ultrafiltración y OI = ósmosis inversa.

### **5.1.2 Microfiltración**

El nejayote pretratado se sometió a un proceso de microfiltración con una membrana de polipropileno con un tamaño de poro nominal de 1  $\mu\text{m}$  (modelo WPC1-975, Watts®). El proceso se llevó a cabo en un régimen de operación continua y la fracción clarificada obtenida se sometió posteriormente a un proceso de ultrafiltración.

### **5.1.3 Ultrafiltración**

El nejayote clarificado se sometió a un proceso de ultrafiltración con una membrana en espiral de polietersulfona de 5 kDa de corte efectivo del peso molecular (MWCO; modelo HKF-328, Koch Membrane Systems, Inc.), de 1.9  $\text{m}^2$  de área. El proceso se realizó a una presión constante de 100 psia y un flujo de entrada de 2 L/min, en un régimen de operación por lotes, con reciclaje y concentración de la corriente de rechazo. Se obtuvieron dos fracciones del proceso: el rechazo concentrado de ultrafiltración y el permeado, que se sometió posteriormente a un proceso de concentración por ósmosis inversa.

### **5.1.4 Ósmosis Inversa (OI)**

Se empleó una membrana de poliamida aromática entrecruzada modelo TMG 10 (Toray Industries Inc.), de 8  $\text{m}^2$  de área. El proceso se realizó a una presión constante de 50 psia y un flujo de alimentación de 2.4 L/min, en un régimen de operación por lotes, con reciclaje y concentración de la corriente de rechazo. De igual manera se obtuvieron dos fracciones; agua en la corriente del permeado que se empleó para lavar las membranas y el rechazo concentrado de ósmosis inversa. El concentrado se almacenó a una temperatura de 4 °C para su posterior secado por aspersion.

### **5.1.5 Desempeño de las Membranas de Ultrafiltración y Ósmosis Inversa**

Se evaluó el desempeño de las membranas midiendo la reducción de flujo del permeado a presión constante y el incremento en los sólidos disueltos totales (SDT) midiendo los grados Brix del rechazo cada diez minutos con un refractómetro de mano, modelo ATAGO Pal. Se determinó el porcentaje de rechazo específico ( $R_i$ ) de los compuestos más representativos de acuerdo a la siguiente ecuación (Cissé et al., 2011).

$$R_i = \left(1 - \frac{C_{p_i}}{C_{f_i}}\right) \quad (1)$$

En donde  $C_{p_i}$  y  $C_{f_i}$  representan la cantidad específica en g/L de cada compuesto presente en el permeado y la alimentación, respectivamente.

### **5.1.6 Secado por Aspersión**

El concentrado de ósmosis inversa se ajustó a pH 6 para llevar a cabo el proceso de secado por aspersión en un secador marca Yamato ADL311S (USA). Se empleó una alimentación de 10 mL/min con una temperatura de entrada y salida de 120 °C y 60 °C, respectivamente. El polvo deshidratado se guardó a una temperatura de 25 °C.

### **5.1.7 Análisis Físicoquímico de las Fracciones de Filtración y Polvo Deshidratado**

Las fracciones obtenidas en las operaciones de microfiltración, ultrafiltración y ósmosis inversa se analizaron en su contenido de sólidos solubles totales, arabinoxilanos, azúcares reductores libres, fenoles totales, ácido ferúlico y ácido

*p*-cumárico. Para el análisis del polvo deshidratado de nejayote, se pesaron 10 mg y se resuspendieron en 1 mL de agua destilada procediendo luego de manera similar a las otras fracciones.

5.1.7.1. Sólidos disueltos totales (SDT). Se cuantificaron de acuerdo a la metodología descrita por la AOAC, 986.25, (2000). Se agregaron 2 mL de la muestra en charolas de aluminio a peso constante y se secaron en una estufa Yamato DX402 a 60°C por 48 horas. Posteriormente, se enfriaron en un desecador hasta peso constante y se determinó el contenido de SST por diferencia de peso. Los resultados se expresaron como g de SST por kilogramo de materia seca (g/ kg MS).

5.1.7.2. Sólidos suspendidos totales (SST). Se cuantificaron de acuerdo a la metodología descrita por la APHA, 2540D, (1995). Los sólidos en suspensión contenidos en el nejayote se separaron por medio de un filtro de tambor rotatorio y estos se secaron a peso constante a 80 °C en una estufa Yamato DX402 por 48 horas. Los resultados se expresaron es g de SST/ L.

5.1.7.3 Azúcares reductores (AR). Se cuantificaron de acuerdo a la metodología propuesta por Miller (1959), con algunas modificaciones. Se tomaron 100 µL de muestra y se añadieron 100 µL del reactivo DNS (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, USA), la mezcla se llevó a baño maría a 100 °C durante 5 minutos. Se enfriaron las muestras en hielo durante 10 minutos y finalmente se agregó 1 mL de agua destilada. Se leyó la absorbancia de las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro JBL modelo Eon One y el contenido de AR de las muestras se cuantificó con base a una curva de concentración de glucosa, en un rango de 0 a 2 g/L. El contenido de AR de las muestras se reportó como g equivalentes de glucosa/ kg MS.

5.1.7.4. Arabinoxilanos (AX). La extracción de AX se realizó mediante precipitación con etanol, con base a lo reportado por Carvajal-Millan et al. (2005), con algunas modificaciones. A 400  $\mu\text{L}$  de la muestra se agregaron 1200  $\mu\text{L}$  de etanol en tubos eppendorf de 2 mL a peso constante. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex Genie 2 y se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 minutos a una temperatura de 5  $^{\circ}\text{C}$  en una centrifuga refrigerada eppendorf 5417R. El etanol se descartó mediante decantación y la pastilla se secó en una estufa a 60  $^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. El contenido de AX en las muestras se determinó por diferencia de peso en los tubos eppendorf y se expresó como g de AX/ kg MS.

5.1.7.5 Fenoles totales. Se determinó mediante el método de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. Se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de una solución de carbonato de calcio 500 mM y 20  $\mu\text{L}$  del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich®, St Louis Missouri, USA) 1N a 40  $\mu\text{L}$  de muestra diluida 20 veces. La mezcla de reacción se incubó a 40  $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos en la oscuridad, posteriormente se leyó la absorbancia de las muestras a 690 nm en un espectrofotómetro JBL modelo Eon One. El contenido de fenoles totales de las muestras se cuantificó con base a una curva de concentración con ácido ferúlico, en un rango de 0 a 1 mM. Los resultados se expresaron como g equivalentes de ácido ferúlico/ kg de MS.

5.1.7.6 Ácido ferúlico (AF) y *p*-cumárico (ApC). Se cuantificaron mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC). Se utilizó un equipo de HPTLC Camag Linomat 5 (Suiza), usando como aplicador una jeringa Camag de 100  $\mu\text{L}$ . El equipo fue programado para depositar 2 – 4  $\mu\text{L}$  de muestra en los diferentes carriles. Se prepararon estándares de AF y ApC (1 mg/mL), disueltos en etanol y se depositaron de 0.2 - 4  $\mu\text{L}$  de los estándares. Se emplearon placas aminadas Nano-SIL NH<sub>2</sub> UV254 (Sigma-Aldrich), eluidas con hexano: isopropanol: metanol: ácido acético (95:20:5:1). Las placas se secaron en una

campana de extracción y se cuantificó por escaneo densitométrico en un escáner Camag TLC a 320 nm, los resultados se reportaron como g / kg MS.

### **5.1.8 Análisis Estadístico**

Se realizaron cinco procesos experimentales de filtración por membrana, y se analizaron por duplicado los parámetros fisicoquímicos de cada fracción obtenida. Los parámetros fisicoquímicos de cada fracción obtenida se reportaron como la media  $\pm$  la desviación estándar y se compararon mediante una prueba de t para dos muestras independientes. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva en el programa estadístico NCSS versión 7.0 (Number Cruncher Statistical System for Window, Kaysville, Utah, USA). Los resultados se expresaron como el promedio de los cinco procesos de filtración  $\pm$  la desviación estándar.

## 5.2 Sistema de Células en Reposo y en Crecimiento de *Bacillus megaterium* para la Biotransformación de AF a 4VG

### **5.2.1 Cultivo Líquido de *B. megaterium***

El cultivo de *B. megaterium* se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Karmakar et al. (2000), con algunas modificaciones. La cepa se sembró en agar nutritivo con una concentración de 15 mM de AF y se incubó a una temperatura de 37°C por 24 horas. Se inocularon dos matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo comercial de soya-tripticaseína (TSB, BD Diagnostic Systems) con una colonia aislada de la cepa. Se incubaron a una temperatura de 37°C y 120 rpm durante 12 horas (New Brunswick Scientific, Innova 44). El cultivo líquido de *B. megaterium* fue empleado como inóculo para los sistemas de biotransformación con células en reposo y en crecimiento.

### **5.2.2 Biotransformación de AF Puro en un Sistema de Células en Reposo**

Se evaluó un sistema de biotransformación con AF puro en un sistema de células en reposo, de acuerdo a lo reportado por Vyrides et al. (2015), con algunas modificaciones. Las células obtenidas del cultivo líquido se cosecharon en la fase estacionaria de crecimiento en donde, se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 4 °C (Scientific SL 16R). El sobrenadante se desechó y se realizaron tres lavados sucesivos de las células con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7. Posteriormente, el pellet se resuspendió en buffer de fosfatos 50 mM a pH 7 con concentraciones de 5, 10, 15 y 25 mM de AF. El sistema se llevó a cabo en viales de centelleo de 20 mL conteniendo 10 mL de reacción y una concentración inicial de 4 g/L de biomasa. Finalmente, se incubaron a 37 °C y 120 rpm durante 24 horas (New Brunswick Scientific, Innova 44). Se realizó un muestreo sucesivo cada dos horas y las muestras se congelaron a -10 °C hasta posteriores análisis.

### **5.2.3 Biotransformación de AF con Polvo Reconstituido en un Sistema de Células en Crecimiento**

Se preparó una solución acuosa al 3.2% p/v a partir de nejayote en polvo, obtenido de la deshidratación del concentrado de ósmosis inversa, hasta alcanzar una concentración aproximada de 5 mM de AF, ajustando el pH de la solución a 7. El proceso de biotransformación se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por Baqueiro-Peña et al. (2010), con algunas modificaciones. En viales de centelleo conteniendo 10 mL de la solución reconstituida de nejayote, fueron inoculados con 0.5 mL de cultivo líquido de *B. megaterium*. Los viales se incubaron a 37°C y 120 rpm durante 12 horas (New Brunswick Scientific, Innova 44). Posteriormente, las muestras tomadas cada 2 horas se congelaron una temperatura de -10 °C para análisis posteriores.

#### **5.2.4 Biotransformación de AF con Nejayote Enriquecido en un Sistema de Células en Crecimiento**

El nejayote clarificado (5 mM de AF) se enriqueció con AF puro hasta alcanzar concentraciones de 10, 15 y 25 mM. En matraces Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 100 mL de las soluciones enriquecidas de nejayote, se inocularon con 5 mL del cultivo líquido de *B. megaterium*. Posteriormente, se incubaron a 37 °C y se agitaron a 120 rpm durante 12 horas (New Brunswick Scientific, Innova 44). Se realizó un muestreo cada dos horas y las muestras se congelaron a -10 °C, para posteriores análisis.

#### **5.2.5 Determinaciones Analíticas**

5.2.5.1 Biomasa. Se cuantificó de acuerdo a la metodología descrita por la AOAC, 986.25, (2000). Se tomó 1 mL de la muestra de biotransformación y se agregó a un tubo eppendorf de 2 mL a peso constante. Posteriormente se centrifugó la muestra a 13,000 rpm durante 20 minutos (eppendorf 5417R). El sobrenadante se desechó y el pellet se secó en una estufa Yamato DX402 a 60°C por 48 horas. Finalmente, la biomasa se determinó por diferencia de peso y el resultado se expresó como g/L.

5.2.5.2 Cuantificación de AF y 4VG. Las muestras se centrifugaron a 9,000 rpm durante 15 minutos (Eppendorf 5417R) y el sobrenadante se filtró con una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.22 µm. El AF y el 4VG se cuantificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un cromatógrafo Varian 920-LC equipado con bombas cuaternarias, y un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 254 y 320 nm. Se utilizó una columna Phenomenex ODS-2 5 µm 250 x 4.6 mm y la fase móvil empleada fue acetonitrilo: agua: ácido trifluoroacético (60:40:0.001) con un flujo de 1 mL/min y la temperatura de la columna de 35°C.

Como un segundo método, el AF y el 4VG se cuantificaron por cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), con el equipo descrito en la sección 5.1.7.6. En este caso el equipo fue programado para depositar 0.2 – 3 µL de muestra en los diferentes carriles. Se prepararon estándares de AF y 4VG (1 mg/mL) disueltos en etanol y se depositaron de 0.2 - 12 µL de los estándares. Se emplearon placas aminadas como se describe en la sección 5165 y en este caso se eluyeron con tolueno: acetato de etilo: ácido acético (90:25:1). Las placas se secaron en una campana de extracción y la cuantificación se realizó por escaneo densitométrico en un escáner Camag TLC a 260 y 320 nm, y el contenido de AF y 4VG se reportó en mM.

5.2.5.3 Cuantificación de fenoles totales. Se determinaron como se describe en la sección 5.1.7.5. El contenido de fenoles se expresó como g equivalentes de ácido ferúlico/L.

### 5.2.6 Parámetros Cinéticos

Se determinó el rendimiento sustrato-producto, el porcentaje molar de consumo de AF y la productividad de los procesos de biotransformación de acuerdo a las siguientes ecuaciones.

$$Y_P = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (1)$$

$$\% \text{ Consumo AF} = \frac{S_0 - S}{S_0} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Prod} = \frac{[4VG]}{t} \quad (3)$$

En donde:

$Y_{P/S}$  = rendimiento molar de producto con base al sustrato

P = la concentración molar final de 4VG

$P_0$  = concentración molar inicial de 4VG

$S_0$  = concentración molar inicial de AF

S = concentración molar final de AF

Prod = productividad [mM/h]

[4VG] = concentración molar máxima alcanzada de 4VG

t = tiempo transcurrido (h) para alcanzar la concentración máxima de 4VG

La tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) de *B. megaterium* se calculó con base a la siguiente fórmula. Se tomó la parte lineal de la curva al inicio y final de la fase exponencial. En donde X y  $X_0$  representan la densidad óptica inicial y final y t y  $t_0$  sus tiempos respectivos, en la fase exponencial.

$$\mu = \frac{X - X_0}{t - t_0} \quad (4)$$

### 5.2.7 Análisis Estadístico

El proceso de biotransformación para cada sistema evaluado se realizó por duplicado. Los parámetros cinéticos para cada sistema se reportaron como la media  $\pm$  la desviación estándar y se compararon mediante la prueba de Tukey-Kramer a un 95% de confianza. El análisis se llevó a cabo en el paquete

estadístico NCSS versión 7.0 (Number Cruncher Statistical System for Window, Kaysville, Utah, USA).

### 5.3 Sistema de Biocatálisis con Células Completas de *Bacillus megaterium* para la Descarboxilación de AF

#### 5.3.1 Obtención del Biocatalizador

La obtención del biocatalizador se realizó de acuerdo a lo reportado por Ashengroph et al. (2012), con algunas modificaciones. Se inoculó con el 5% v/v de un cultivo líquido de *B. megaterium* en 5 matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de nejayote clarificado y se incubaron a una temperatura de 37 °C y 120 rpm durante 12 horas (New Brunswick Scientific, Innova 44). Las células se cosecharon por centrifugación a 13, 000 rpm durante 20 minutos y se realizaron tres lavados sucesivos con agua destilada. Las células de los cinco matraces se resuspendieron en un volumen final de 150 mL y se añadió 1 mL en tubos eppendorf. Finalmente, se centrifugó bajo las condiciones descritas y las células se congelaron a una temperatura de -10 °C sin crioprotector, para garantizar la pérdida de viabilidad.

#### 5.3.2 Actividad Descarboxilasa del Biocatalizador

La actividad descarboxilasa de las células completas de *B. megaterium* se cuantificó por un método en microplaca (JBL, Eon One) con base a lo reportado por Camacho-Ruiz et al. (2015), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción con 950 µL de una solución 2.5 mM (0.5 g/L) de AF en buffer de fosfatos 50 mM a pH 7 y 50 µL del extracto celular (0.15 mg/mL de biomasa). La descarboxilación se llevó a cabo en un equipo termomixer (Eppendorf Confort) a una temperatura de 30 °C y 1,000 rpm por 10 minutos. Se tomó muestra de la reacción y se diluyó 20 veces con buffer de citratos 20 mM a pH

4.5, del tiempo 0 y 10 min. La velocidad inicial se calculó con base a la disminución de la absorbancia del pico del AF a una  $\lambda_{max}$  de 320 nm en el tiempo de reacción evaluado. La velocidad inicial más alta se tomó como el 100% y el resto de los valores se relativizaron con respecto a este. Adicionalmente, se evaluó la descarboxilación de los siguientes ácidos hidroxicinámicos: *o*-cumárico (oC), *m*-cumárico (mC), *p*-cumárico (pC), sinápico (SP), cafeico (CF) y cinámico (CN) a una concentración de 2.5 mM (0.5 g/L).

### **5.3.3 Efecto de la Temperatura y pH en la Actividad Descarboxilasa del Biocatalizador**

El efecto de la temperatura y el pH sobre la descarboxilación del AF se realizó de acuerdo a lo reportado por Gu et al. (2011), con algunas modificaciones. La temperatura óptima de la descarboxilación del AF a una concentración de 2,5 mM, se evaluó calculando la velocidad inicial a un rango de 20-70 °C a pH 7. Mientras que el pH óptimo se evaluó con diferentes buffers a la misma concentración de AF (buffer citratos para pH 4-5.5; buffer fosfatos para 6 y 7; buffer Tris-NaOH para 8 y buffer glicina para 9 y 10). Tanto la estabilidad térmica y de pH se estimó midiendo la actividad descarboxilasa residual a 0, 15, 30, 120 y 240 minutos de incubación sin el sustrato y se calculó la vida media ( $t_{1/2}$ ). La estabilidad térmica se evaluó incubando las células durante 4 horas a 30, 40 y 50 °C en un buffer de fosfatos 50 mM a pH 7. La estabilidad de pH se evaluó incubando las células durante 4 horas en buffer citratos a pH 5 y con buffer de fosfatos a pH 6 y 7, a una temperatura de 30°C.

### **5.3.4 Sistema de Biocatálisis Monofásico de Células Completas para la Descarboxilación del AF**

La descarboxilación del AF en el sistema de biocatálisis monofásico se realizó acorde a lo reportado por Hu et al. (2015), con algunas modificaciones. La

mezcla de reacción fue de 900  $\mu\text{L}$  de AF contenido en buffer de fosfatos 50 mM a pH 7 y nejayote clarificado, a las concentraciones previamente evaluadas (5, 10, 15 y 25 mM de AF), y 100  $\mu\text{L}$  del biocatalizador (1.2 mg/mL biomasa). La descarboxilación del AF se llevó a cabo en un equipo termomixer (Eppendorf Confort) a una temperatura de 30 °C y 1,000 rpm durante 12 horas. Se cuantificó el consumo de AF y la producción de 4VG HPTLC, con el método descrito en la Sección 5.2.5.2.

### **5.3.5 Sistema de Biocatálisis Bifásico de Células Completas para la Descarboxilación del AF**

El sistema bifásico empleado para la descarboxilación del AF se llevó a cabo con base a lo reportado por Lee et al. (1998), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía 450  $\mu\text{L}$  de nejayote a 5, 10, 15, 25, 50, 100 y 500 mM de AF, 50  $\mu\text{L}$  del biocatalizador (1.2 mg/mL biomasa) y 500  $\mu\text{L}$  de hexano. La mezcla de reacción se incubó en un equipo termomixer (Eppendorf Confort) a una temperatura de 30 °C y 1,000 rpm durante 12 horas. Se cuantificó el consumo de AF y la producción de 4VG por HPTLC, con el método descrito en la Sección 5.2.5.2.

### **5.3.6 Purificación Secundaria del AF Contenido en el Polvo Deshidratado para la Producción de 4VG**

Se añadieron 50 g de polvo deshidratado de nejayote en 465 mL de acetato de etilo en agitación constante durante 15 minutos y posteriormente se añadieron 35 mL de agua destilada. La mezcla acetato de etilo: agua se evaporó a 40 °C en un rotavapor (Laborota 4011). Los cristales de AF se guardaron a una temperatura de 4 °C para posteriores análisis.

La producción de 4VG se llevó a cabo en un sistema de biocatálisis de células completas, como se describió anteriormente (Sección 5.3.5). La concentración inicial fue de 100 mM del AF purificado a partir del polvo deshidratado y se cuantificó la producción de 4VG por HPTLC, de acuerdo a la metodología presentada en la Sección 5.2.5.2.

### **5.3.7 Parámetros Cinéticos**

Se determinó el rendimiento sustrato-producto, el porcentaje molar de consumo de AF y la productividad de los procesos de biocatálisis de acuerdo a las ecuaciones presentadas en la Sección 5.2.6.

### **5.3.8 Análisis Estadístico**

El proceso de biotransformación para cada sistema evaluado se realizó por duplicado. Los parámetros cinéticos para cada sistema se reportaron como la media  $\pm$  la desviación estándar y se compararon mediante una prueba de t para muestras independientes a un 95% de confianza. El análisis se llevó a cabo en el paquete estadístico NCSS versión 7.0 (Number Cruncher Statistical System for Window, Kaysville, Utah, USA).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Valorización de un Efluente Líquido de la Industria del Nixtamal (Nejayote) Mediante un Sistema Integral de Membranas y Secado por Aspersion

#### 6.1.1 Composición de Nejayote

Para los estudios se emplearon en promedio 100 L de nejayote, los cuales al final de los pretratamientos de neutralización, hidrólisis enzimática de los gránulos de almidón y floculación de los sólidos en suspensión dieron lugar aproximadamente a 58 L de un líquido libre de sólidos en suspensión (nejayote clarificado) y 42 L de un lodo conteniendo los sólidos floculados, los cuales no forman parte del presente estudio. Para asegurar que la solución quedará libre de sólidos en suspensión, esta fue filtrada a través de filtros de 1  $\mu\text{m}$ . Los parámetros característicos del nejayote antes y después del pretratamiento y filtración se presentan en la Tabla 2.

La composición del nejayote presentó ligeras variaciones en la mayoría de los parámetros evaluados, con desviaciones estándar que oscilan entre el 5 al 16% de las medias. Estas variaciones son atribuidas principalmente a las variaciones en las condiciones de operación del proceso de nixtamalización, debido a que no son del todo controladas, especialmente en tortillerías de pequeña escala (Gutiérrez-Urbe et al., 2010; Ruiz-Gutiérrez et al., 2010).

Tabla 2. Composición fisicoquímica de nejayote inicial y clarificado obtenido de un proceso de microfiltración.

<b>Composición (g/L)</b>	<b>Nejayote inicial</b>	<b>Nejayote clarificado</b>
AX cadena larga	19.73 ± 3.52 <sup>a</sup>	18.63 ± 1.60 <sup>a</sup>
AR libres	0.13 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.08 <sup>b</sup>
Fenoles totales	1.72 ± 0.17 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.15 <sup>a</sup>
AF	0.93 ± 0.16 <sup>a</sup>	0.95 ± 0.20 <sup>a</sup>
ApC	0.07 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.06 ± 0.02 <sup>a</sup>
SDT	31.87 ± 5.72 <sup>a</sup>	28.68 ± 6.21 <sup>a</sup>
SST	8 ± 1.4 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.2 <sup>b</sup>

Los datos se representan como la media ± la desviación estándar de cinco procesos experimentales independientes. Diferente literal en la misma línea indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de t para muestras independientes.

Se ha reportado que el incremento en la concentración de sales de calcio y el tiempo de cocción de los granos de maíz acelera la remoción del pericarpio y propicia la hidrólisis de los polisacáridos de cadena larga liberando oligómeros ferulados y azúcares reductores (Ochoa et al., 2009). El contenido de AX obtenido en el nejayote representa el 62% del contenido total de los SDT. Serna-Saldivar et al. (1990), reportaron que el contenido de los polisacáridos no amiláceos representa un porcentaje similar al reportado en el presente estudio del 60%.

En el caso de los AR, la cantidad detectada en el nejayote sin tratar es muy baja, indicando un grado de hidrólisis baja del almidón, celulosa y hemicelulosa del pericarpio de maíz durante la nixtamalización. Ramírez-Romero et al. (2013) reportaron una concentración de 0.46 g/L de AR. Por otro lado, Ignacio-Pacheco (2015) reportó un contenido de 3.66 g/L de AR, lo cual es superior a lo detectado en el presente estudio.

En el caso de los compuestos fenólicos, su contenido en el nejayote varía dependiendo de la variedad y la cantidad de maíz empleados en el proceso de nixtamalización (López-Martínez et al., 2009). El contenido de fenoles totales de

nejayote reportado por Castro-Muñoz et al. (2015) fue de 0.97 g/L, lo cual es 1.77 veces menor a lo cuantificado en el presente estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos, de los compuestos fenólicos, destacan en particular el ácido ferúlico, que representa aproximadamente el 50%, seguido por el ácido p-cumárico, que representa el 3%. Asaff et al. (2008) reportaron un contenido aproximado de 1 a 2 g/L de AF, lo cual fue similar a la concentración de 1 g/L obtenido en este estudio. El 47% de los compuestos fenólicos restantes son de naturaleza desconocida, debido a que no se pudieron identificar en el presente estudio. Otros reportes señalan el contenido de otros compuestos fenólicos diferentes al AF. Ayala-Soto et al. (2014), identificaron dímeros y trímeros del AF unidos a oligómeros de arabinosa y xilosa. López-García (2015), identificó por cromatografía en capa fina la presencia de pentosanas feruladas de baja polaridad y por cromatografía de convergencia de ultra desempeño (UPC<sup>2</sup>), vainillina y 4-vinilguayacol. Estos últimos no fueron detectados en el presente estudio, posiblemente por su baja concentración.

En relación a los SDT y SST, Valderrama-Bravo et al. (2012) reportaron un contenido de SST de 8.3 g/L, similar a lo obtenido. Por el contrario, estudios recientes realizados por Meraz et al. (2016) reportaron un contenido de SST menor a 0.2 g/L y un contenido de 46.5 g/L de SDT. Estas diferencias encontradas con lo reportado pueden ser debido a las diferentes condiciones de nixtamalización y al tiempo de remojo del grano de maíz empleados en las tortillerías a pequeña escala (Rosentrater, 2006).

El tratamiento del nejayote para eliminar los SST no tuvo efecto sobre los diferentes parámetros evaluados, salvo el referido a los AR donde hay un incremento de alrededor de seis veces, resultando evidente que el tratamiento enzimático para eliminar los gránulos de almidón, fue el causante de este aumento (Tabla 2).

Resulta también altamente relevante la confirmación de la efectividad del método descrito en la solicitud de patente Mx/2013/002096 para la remoción de SST ya que fue posible eliminarlos en su totalidad. En el mejor de los casos otros reportes señalan contenidos de aproximadamente 130 ppm de SST en nejayote ya filtrado (Valderrama-Bravo et al., 2012). Este aspecto resulta crucial para la operación de sistemas con membranas de ultrafiltración, nanofiltración u ósmosis inversa ya que es conocido que la presencia de SST en fluidos ocasionan el ensuciamiento y taponamiento de este tipo de membranas (Xu et al., 2010).

### **6.1.2 Desempeño de la Membrana de Ultrafiltración (5 KDa)**

El nejayote clarificado obtenido de la microfiltración se sometió a una ultrafiltración con una membrana de polietersulfona de 5 KDa, en un régimen de operación por lotes, con recirculación de la corriente de rechazo. El desempeño de la membrana se evaluó midiendo la reducción del flujo en el permeado y el aumento en la concentración de sólidos solubles en el rechazo como se muestra en la Figura 4.

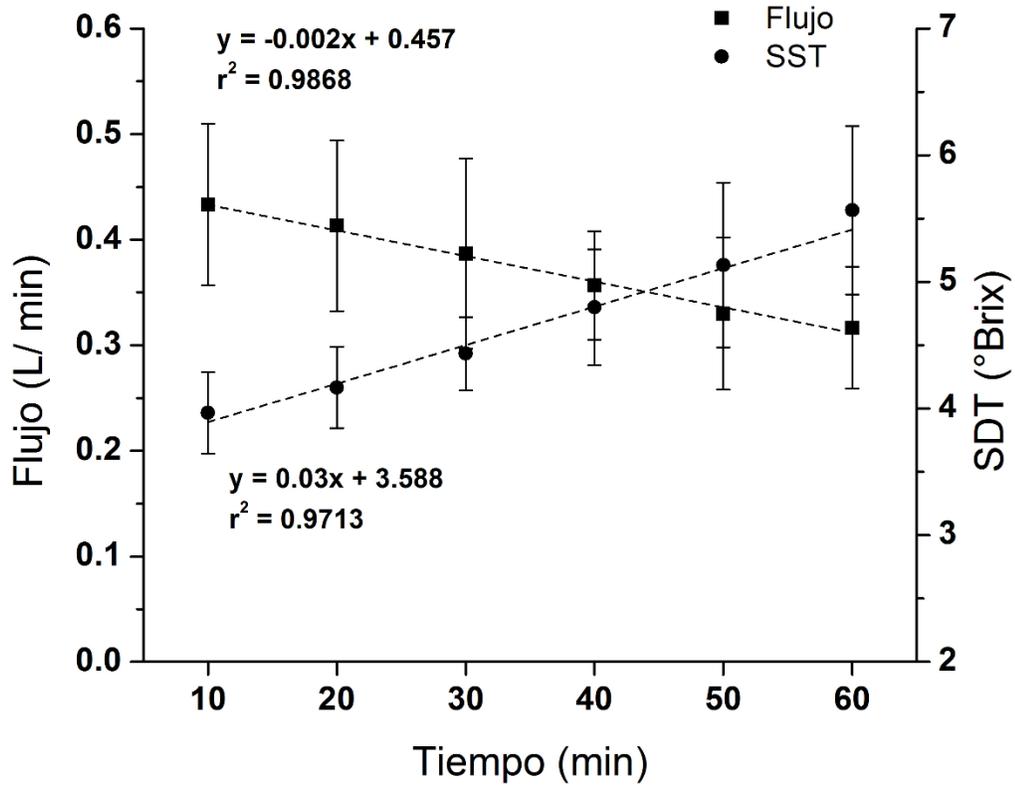


Figura 4. Desempeño de la membrana de ultrafiltración de 5 KDa (condiciones de operación: temperatura 25°C y 100 psia).

Se observa que la caída del flujo y el incremento de los SDT a lo largo del tiempo de operación tuvieron un comportamiento lineal ( $R^2$  de 0.99 y 0.97 respectivamente), marcando una relación inversamente proporcional entre ambos parámetros (Figura 4).

Este tipo de comportamiento resulta frecuente en operaciones con membranas de flujo tangencial debido a fenómenos conocidos como “polarización por concentración” originada en el flujo laminar que suele establecerse en la zona inmediata a las membranas, donde los solutos rechazados se van acumulando y únicamente pueden retornar al seno del líquido por difusión y no por convección forzada que se da en el régimen turbulento. Este fenómeno tiene una influencia elevada en procesos de micro y ultrafiltración, mientras que su

influencia es moderada en procesos de nanofiltración y ósmosis inversa (Guastalli, 2006). En muchos casos, la polarización por concentración puede derivar en la formación de la “capa de gel”. Esto se produce cuando la concentración de ciertos componentes de naturaleza macromolecular se eleva demasiado, de manera que alcanza su límite de solubilidad (Guastalli, 2006).

Es el caso de la filtración del nejayote, donde al final de los procesos es usual observar el escurrimiento de un material altamente viscoso con las características de un gel, formado principalmente por moléculas de arabinoxilanos (AX), presentes en gran cantidad en el nejayote.

El desempeño de los procesos de ultrafiltración está determinado por el corte efectivo de peso molecular (MWCO), el material de la membrana, además de la polaridad de las moléculas a filtrar. Van der Bruggen (2009) establece que la membrana de carácter hidrofóbico como las de polietersulfona, incrementan el porcentaje de rechazo hacia moléculas orgánicas, observando un mayor taponamiento de las membranas. En el caso de los AX rechazados posiblemente se estén acumulando en mayor proporción en la superficie de las membranas, conjuntamente con otras moléculas, como oligómeros o azúcares, debido a la hidrofobicidad de las membranas, agudizando el fenómeno de polarización por concentración. En la Figura 5 se muestra el porcentaje de rechazo de la membrana de polietersulfona de 5 KDa hacia los compuestos evaluados.

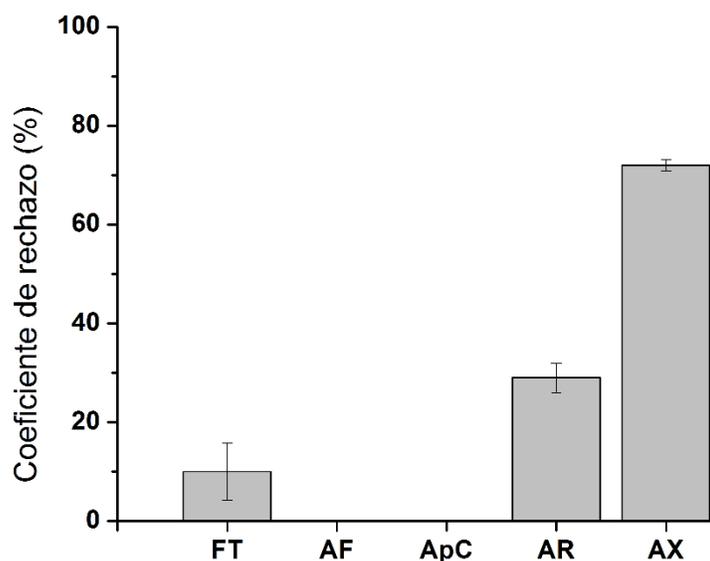


Figura 5. Rechazo (%) de la membrana de ultrafiltración hacia los fenoles totales (FT), ácido ferúlico (AF), ácido *p*-cumárico (ApC), azúcares reductores (AR), arabinosilanos (AX).

La membrana de polietersulfona presentó el mayor porcentaje de rechazo hacia los AX (72%) en comparación a los otros compuestos, debido a su naturaleza polimérica. Sin embargo, el nivel de rechazo indica que al menos un 30% de los AX tienen pesos moleculares inferiores o cercanos al valor de corte de peso molecular de la membrana (5 KDa) por lo que no pueden ser retenidos por esta, tratándose más bien de oligómeros de arabinosa y xilosa. También se observa que un 10% de los fenoles totales fue rechazado, los cuales corresponderían a sus dímeros o trímeros, unidos a oligómeros de arabinosa y xilosa, cuya presencia fue reportada por López-García en el 2015. Otro aspecto a destacar es el rechazo de un 29% de AR, que como se comentó en el punto precedente, podrían estar siendo retenidos en la capa de gel, debido en gran parte al rechazo de un material hidrofóbico como el de polietersulfona de las membranas.

Cassano et al., (2008) reportaron que la selección de una membrana polar de acetato de celulosa con un corte efectivo de peso molecular de 30 kDa permite reducir el % de rechazo hacia los compuestos polares, obteniendo un mejor desempeño en comparación con las de polietersulfona.

En el proceso de ultrafiltración se obtuvieron en promedio 27.6 L del permeado y 22.9 L de rechazo, en donde se consideraron aproximadamente 4.5 L de pérdidas asociados a fugas en las líneas de alimentación y al volumen de nejayote alojado en la carcasa del filtro que no se pudieron recuperar. Con el fin de completar la evaluación de la membrana de ultrafiltración, el rechazo se sometió a un proceso de diafiltración para “lavar” los polisacáridos retenidos, eliminando las moléculas de bajo peso molecular como fenoles, azúcares y sales. La fracción diafiltrada posteriormente fue empleada para otros estudios dentro del grupo de trabajo. En la Tabla 3 se muestra la composición de las fracciones obtenidas del proceso de ultrafiltración.

Tabla 3. Composición fisicoquímica de las fracciones de ultrafiltración (5 KDa) por kg de materia seca.

<b>Composición (g/ kg MS)</b>	<b>Permeado</b>	<b>Rechazo</b>	<b>Rechazo diafiltrado</b>
AX	331 ± 29.6 <sup>c</sup>	658.6 ± 126.9 <sup>b</sup>	910.8 ± 69.6 <sup>a</sup>
AR libres	33.5 ± 3.3 <sup>a</sup>	23.3 ± 4 <sup>b</sup>	25.3 ± 3 <sup>b</sup>
Fenoles totales	104.7 ± 5.4 <sup>a</sup>	47.37 ± 6.1 <sup>b</sup>	36.4 ± 6.6 <sup>c</sup>
AF	67.3 ± 10.1 <sup>a</sup>	16.6 ± 2.8 <sup>b</sup>	5.7 ± 3.4 <sup>c</sup>
ApC	4.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>c</sup>
SDT	1000 ± 246.4 <sup>a</sup>	1000 ± 139 <sup>a</sup>	1000 ± 163.2 <sup>a</sup>

Los datos se representan como la media ± la desviación estándar de cinco procesos experimentales independientes. Diferente literal en la misma línea indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de t para muestras independientes.

Tal como se había mencionado en el punto precedente, el análisis de la fracción del permeado muestra la presencia de AX hasta en un 33%, confirmando que una cantidad importante de estos carbohidratos son más bien de cadena corta,

no pudiendo ser retenidos por la membrana de 5 KDa. Como era de esperar, la fracción concentrada de rechazo mostró un incremento a casi un 70% de AX, subiendo a un 91% en la fracción diafiltrada, confirmando que los AX son los componentes mayoritarios de esta fracción. Por sus características intrínsecas, este material es el que confiere viscosidad al nejayote (Lu y Li, 2006; Paz-Samaniego et al., 2016), por lo que a medida que se va concentrando el nejayote clarificado, el rechazo va incrementando su viscosidad, favoreciendo el fenómeno de polarización por concentración, al disminuir la velocidad en la zona cercana a la membrana y la turbulencia en el seno del líquido (Gonzales-Santander y Castellano-Estornell, 2014).

En el caso de los fenoles totales, el AF y el ApC, su proporción se incrementó en el permeado al disminuir la cantidad de AX y contrariamente disminuyó en el rechazo al subir la concentración de AX. Sin embargo, llama la atención que en el caso del AF y el ApC, su contenido en el rechazo diafiltrado fue casi 300% más bajo que en el rechazo sin diafiltrar, mientras que en el caso de los fenoles totales la cantidad contenida en el rechazo diafiltrado fue apenas 30% menor que la contenida en el rechazo sin diafiltrar. Este porcentaje corresponde en proporción a las cantidades de AF y ApC que fueron lavadas durante la diafiltración. Se conoce que los AX contienen residuos de fenoles unidos a las cadenas de arabinosa y xilosa que sirven de puente para el crecimiento de las matrices poliméricas, promoviendo la formación de geles cuando se encuentran en soluciones acuosas bajo condiciones oxidantes (Berlanga-Reyes et al., 2009). Bajo esta consideración se puede mencionar que una gran parte de los fenoles totales corresponderían a compuestos unidos aún a cadenas de AX y/o a moléculas de lignina de alto peso molecular, tal cual se menciona en el trabajo de López-García (2015).

En el presente estudio no se cuantificó el contenido de sales de calcio y oligómeros de arabinosa y xilosa en el nejayote, no obstante, trabajos realizados por el grupo de trabajo reportaron un contenido aproximado de 233.6 g/ Kg MS (Ignacio-Pacheco, 2015). De acuerdo al balance de SDT, se estimó

que el contenido de oligómeros de xilosa y arabinosa es de 226.6 g/ kg MS en el permeado de ultrafiltración. Por otra parte, la cantidad de sales de calcio y oligómeros es relativamente más baja en el rechazo, debido a que los AX representan el contenido mayoritario.

### **6.1.3 Desempeño de la Membrana de Ósmosis Inversa**

Con el objetivo de obtener un sustrato rico en AF como precursor de la producción biotecnológica del 4-vinilguayacol, el permeado de ultrafiltración (5 kDa) se concentró por medio de ósmosis inversa, empleando una membrana de poliamida, en un régimen de operación por lotes, con recirculación de la corriente de rechazo. El desempeño de la membrana se evaluó midiendo la reducción del flujo en el permeado y el aumento en la concentración de sólidos solubles en el rechazo, tal como se muestra en la Figura 6.

El flujo inicial del permeado (0.84 L/min) disminuyó drásticamente después de los 20 minutos de operación hasta alcanzar finalmente un flujo de 0.1 L/min a los 60 minutos. Se observó que al cabo de 40 minutos de operación la concentración de SDT en el rechazo, casi fue duplicada, posteriormente, no hubo cambios en la concentración al tener un flujo de permeado prácticamente detenido, marcando el límite de la operación de concentración por OI.

Se conoce que las membranas de poliamida son más rugosas en comparación con las membranas de acetato de celulosa. Esto ocasiona una acumulación de compuestos orgánicos y sales de calcio en la superficie de las membranas causando un fenómeno de colmatación inmediato. Además, genera una mayor resistencia al flujo de agua a través de la membrana (Elimelech et al., 1996).

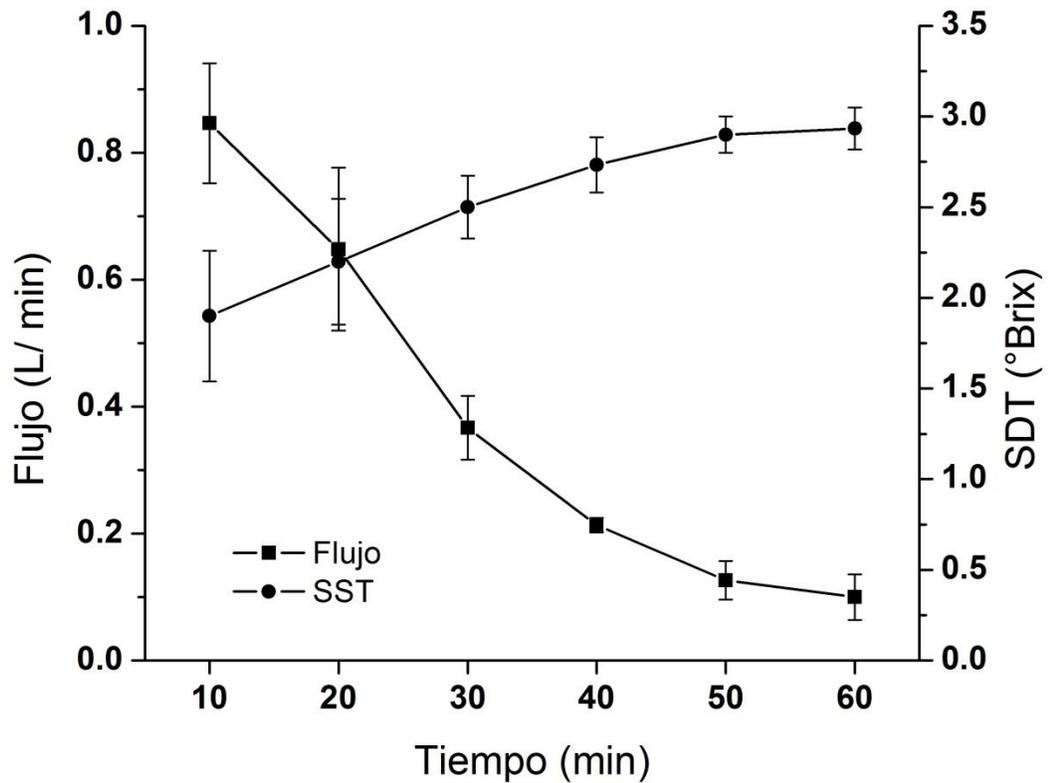


Figura 6. Desempeño de la membrana de poliamida en el proceso de ósmosis inversa (condiciones de operación: temperatura 25°C y 50 psia).

Se realizó un análisis comparativo de la composición fisicoquímica en la alimentación y el concentrado obtenido de la ósmosis inversa, tal como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición fisicoquímica de la alimentación y el concentrado de ósmosis inversa.

<b>Composición (g/ kg MS)</b>	<b>Alimentación OI</b>	<b>Concentrado OI</b>
AX cadena larga	291.4 ± 121 <sup>a</sup>	346.8 ± 55 <sup>a</sup>
AR libres	33 ± 2.6 <sup>a</sup>	32.10 ± 2.5 <sup>a</sup>
Fenoles totales	131.4 ± 21.7 <sup>a</sup>	99.2 ± 18.1 <sup>b</sup>
AF	72.9 ± 10.4 <sup>a</sup>	48.4 ± 4.5 <sup>b</sup>
ApC	4.75 ± 2.1 <sup>a</sup>	2 ± 0.1 <sup>b</sup>
SDT	1000 ± 288.4 <sup>a</sup>	1000 ± 188.5 <sup>a</sup>

Los datos se representan como la media ± la desviación estándar de cinco procesos experimentales independientes. Diferente literal en la misma línea indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de t para muestras independientes.

En el caso de los AX y AR, no se observaron diferencias estadísticas entre su contenido en las corrientes de alimentación y el rechazo al final de la operación de concentración por ósmosis inversa. Sin embargo, en el caso de los fenoles totales, el AF y el ApC, se aprecia una disminución entre el 30 al 50% en su contenido ( $p < 0.05$ ) lo que indica que este material quedó adsorbido en la membrana, fenómeno usual para membranas de este tipo de material (Matsuura y Sourirajan, 1971; Arsuaga et al., 2011). La adsorción de los compuestos fenólicos está asociado a su capacidad de formar puentes de hidrogeno con el material de la membrana de ósmosis inversa, cuando éstos están parcial o totalmente disociados. El AF contenido en el nejayote a pH 8 puede presentar un 98.3% de disociación (debido a su cercanía a su segundo pKa de 8.75) lo cual favorece su adsorción en la superficie de la membrana de poliamida (Goldberg et al., 2011).

Pese a las limitaciones encontradas durante la concentración por ósmosis inversa, se obtuvieron valores de hasta 1.3 g/L de AF, superiores a lo reportado para efluentes líquidos de alcachofa (0.516 g/L) y del molido de la aceituna (0.211 g/L) (García-Castello et al., 2010; Conidi et al., 2014).

#### 6.1.4 Sistema Integral de Filtración por Membranas

Se realizó el balance de materia del proceso integral, considerando el acoplamiento de las operaciones de ultrafiltración (5kDa) y ósmosis inversa (Figura 7). En el balance de materia se consideraron los rechazos de las corrientes de ultrafiltración y ósmosis inversa, y el permeado de ósmosis inversa el cual no contiene sólidos disueltos. El porcentaje de recuperación del AF y el ApC fue menor del 77%, mostrando una retención de estos compuestos fenólicos en la superficie de la membrana de OI (Tabla 5).

Tabla 5. Balance de materia (porcentaje de recuperación) del proceso integral de filtración por membranas.

<b>Compuesto</b>	<b>Balance de materia (% de recuperación)</b>
Fenoles totales	94
Ácido ferúlico	75
Ácido <i>p</i> -cumárico	76
Arabinoxilanos	86
Azúcares reductores	97
Sólidos disueltos totales	98

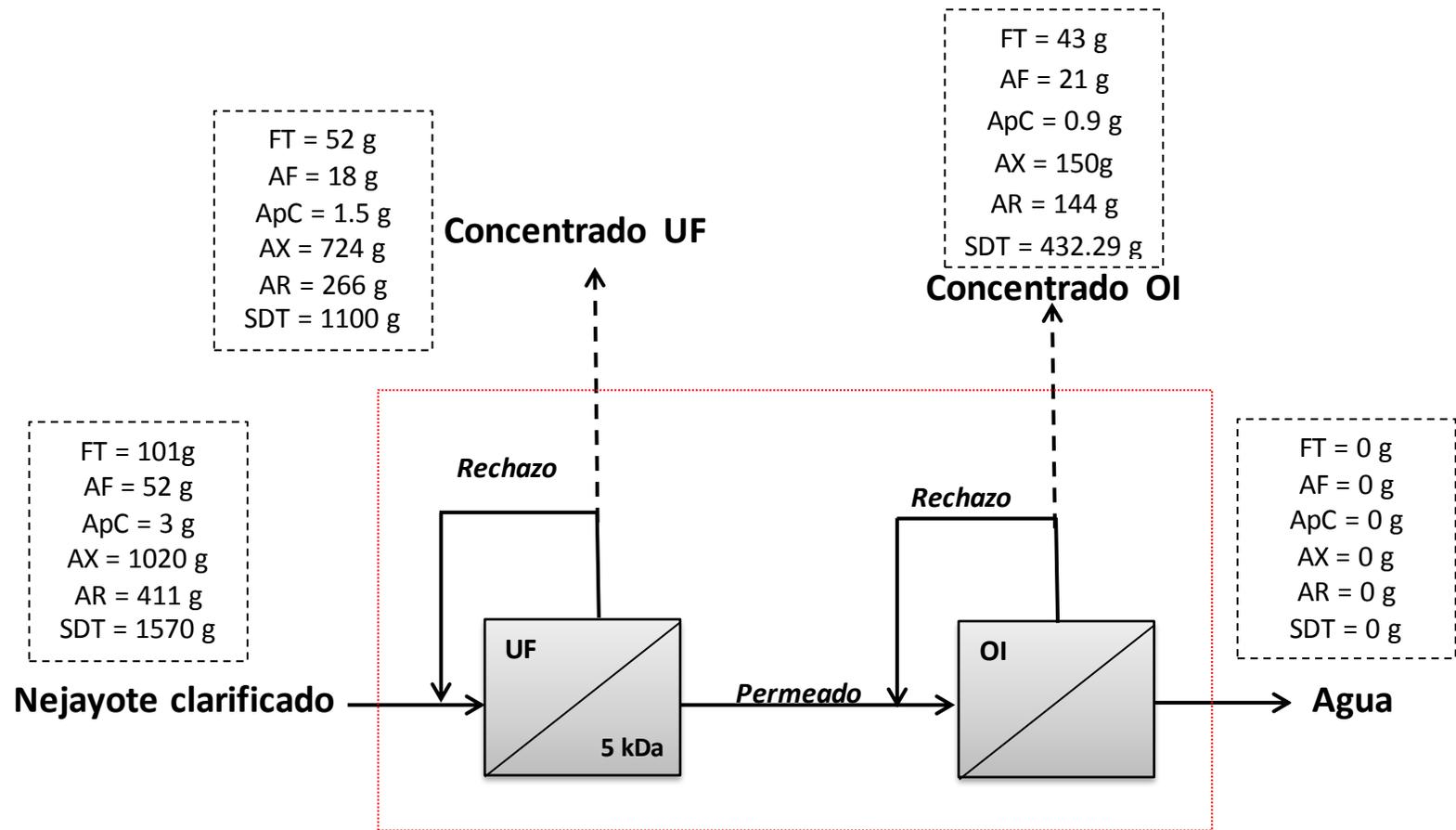


Figura 7. Balance de materia en el tratamiento del nejayote por un sistema integral de filtración por membrana.

### 6.1.5 Secado por Aspersión del Concentrado de Ósmosis Inversa

El concentrado de OI se sometió a un proceso de secado por aspersión para evitar la degradación química y/o biológica de los compuestos fenólicos y su composición fisicoquímica se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición fisicoquímica del polvo deshidratado de nejayote.

Composición (g/ kg MS)	Polvo deshidratado
AX	na*
AR libres	24.9 ± 4.1
Fenoles totales	72.3 ± 14.3
AF	36.2 ± 11.5
ApC	2.4 ± 0.6

Los datos se representan como la media ± la desviación estándar de seis lotes de polvo deshidratado analizado. \*na= no analizados.

El contenido de fenoles totales representaron el 7.2% del contenido de sólidos solubles del polvo deshidratado de nejayote, de los cuales el 50% de estos compuestos fue AF y solamente el 2.5% fue ApC. Cabe desatacar, que se observó una reducción en el contenido de fenoles totales (27%) y de AF (25%) posterior al proceso de secado por aspersión, en relación al contenido del material de partida (Tabla 4). Esta reducción en el contenido de compuestos fenólicos puede ser atribuida a las temperaturas de operación del secado por aspersión de 120 °C y 60 °C en la entrada y salida, respectivamente. Yilmaz et al. (2011) reportaron que los compuestos fenólicos se degradan a temperaturas superiores a 55 °C. Por otra parte, Arrieta-Báez et al. (2012), reportan que temperaturas de 121 °C causan cambios estructurales y la formación de dímeros de los ácidos hidroxicinámicos.

Los AX de cadena larga no fueron cuantificados en el polvo, pero considerando el contenido del concentrado de ósmosis, se puede asumir que estos

representan aproximadamente el 35% del contenido de sólidos solubles ( $346.8 \pm 55$  g/ kg MS). Las sales de calcio y oligómeros de arabinosa y xilosa representarían el 23% y el 28%, de acuerdo a lo reportado por Ignacio-Pacheco (2015).

### **6.1.6 Conclusiones**

El proceso integral de filtración por membranas evaluado en el presente trabajo, permite el tratamiento efectivo de un efluente altamente contaminante mediante la separación de sus fracciones que pueden ser empleadas como fuentes de materiales parcialmente purificados con potencial comercial.

Interacciones moleculares entre los compuestos fenólicos y la superficie de la membrana de ósmosis inversa ocasionan pérdidas de este tipo de material, debido a que quedan adsorbidos en su superficie por lo que el proceso de concentración resulta deficiente. También durante el secado por aspersion del concentrado de ósmosis inversa se evidencia pérdida del material fenólico, pese a los cortos tiempos de duración del proceso.

### **6.1.7 Recomendaciones y Perspectivas**

- 1.- Analizar la influencia del pH del nejayote sobre los procesos de filtración por membrana, particularmente por ósmosis inversa, para evitar la adsorción de los compuestos de interés.
- 2.- Estudiar membranas de ósmosis inversa o de nanofiltración de cortes efectivos muy bajos ( $< 100$  kDa), construidas con materiales diferentes a la poliamida para minimizar la adsorción de compuestos fenólicos.
- 3.- Caracterizar membranas de ultrafiltración de cortes efectivos de 1000 kDa o menores para lograr una separación efectiva de los arabinoxilanos de cadena

larga u oligómeros que luego pueden interferir en los procesos de concentración por ósmosis inversa.

4.- Optimizar las condiciones de las temperaturas del secado para reducir la degradación de los compuestos fenólicos de interés, como el AF.

5.- Estudiar el material contenido en el concentrado de ultrafiltración como fuente de carbohidratos para la producción de biocombustibles.

## 6.2 Sistema de Células en Reposo y en Crecimiento de *Bacillus megaterium* para la Biotransformación de AF a 4VG

### 6.2.1 Biotransformación de AF Puro en un Sistema de Células en Reposo

Se evaluó la eficiencia de transformación, medida a través de diferentes parámetros cinéticos, de un sistema de células en reposo con soluciones de AF de diferente concentración (5, 10, 15 y 25 mM en buffer de fosfatos). Las cinéticas de biotransformación se muestran en la Figura 8.

En la cinética de biotransformación para una concentración inicial de 5 mM de AF, en donde se observa que el proceso arrancó de forma inmediata, alcanzando un máximo de 3.8 mM de 4VG a las 12 horas, con un remanente de 1.42 mM de AF, que corresponden a una productividad de 0.32 mM/h de 4VG, un rendimiento molar de bioconversión del 76% (Figura 8A). Posterior a este periodo, la producción de 4VG se detuvo, aunque el consumo de AF continuó hasta las 24 h. Posiblemente a partir de las 12 horas, el 4VG empieza a degradarse alcanzando un equilibrio dinámico entre la velocidad de formación y la velocidad de degradación o en su defecto el AF es metabolizado, favoreciendo la formación de otros subproductos o intermediarios. Al cabo de 24 h, el porcentaje de consumo de AF fue del 89%. Chai et al. (2013), reportaron la capacidad de la cepa *Cupriavidus* sp. B-8 para la

biotransformación del AF, sin embargo, el 4VG producido fue rápidamente metabolizado en ácido vainillínico y ácido protocatecólico.

Estos resultados demuestran una productividad de 4VG mucho más elevada a la de otros reportes. Por ejemplo, Mishra et al. (2014), reportaron una productividad de 0.05 mM/h de 4VG empleando una cepa de *Bacillus cereus*, con una concentración inicial de 2.5 mM de AF. Recientemente, Paz et al. (2016), obtuvieron una productividad de 0.02 mM/h, empleando una cepa de *Bacillus aryabhatai* con una concentración inicial de 5 mM de AF.

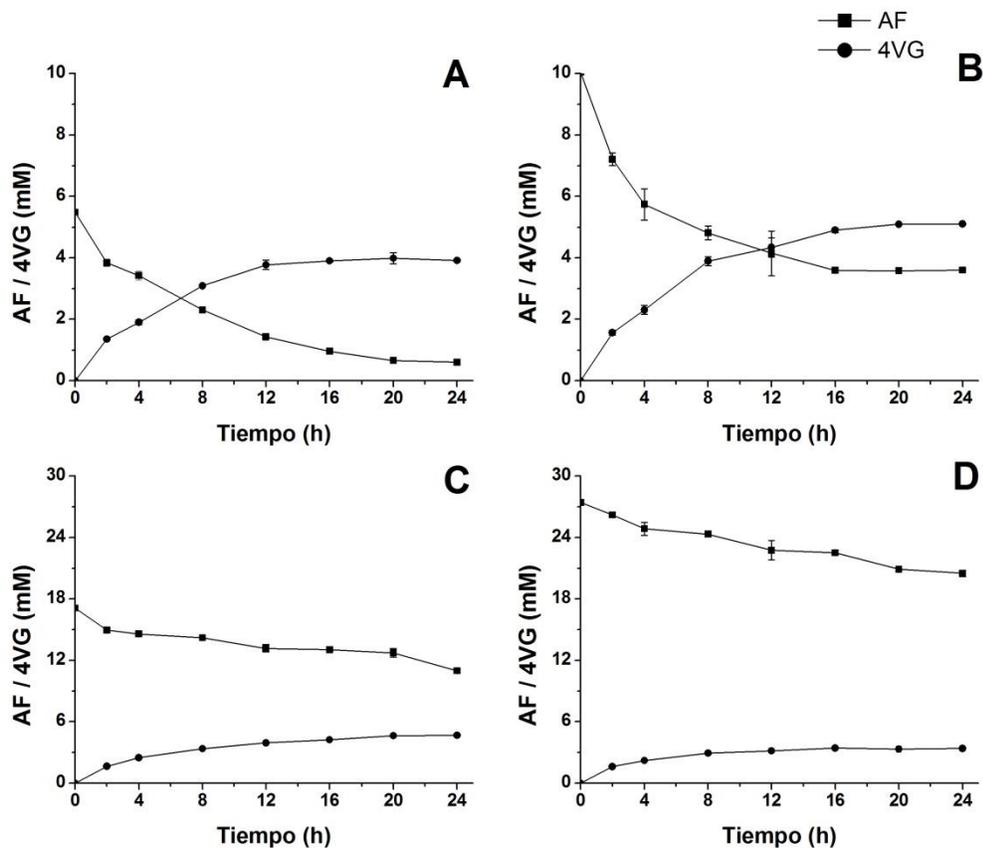


Figura 8. Cinéticas de biotransformación en un sistema de células en reposo de *B. megaterium* a concentraciones variables de AF. A) 5 mM AF, B) 10 mM AF, C) 15 mM AF y D) 25 mM AF.

En la cinética de biotransformación con 10 mM de AF se observó un máximo de producción de 4.9 mM de 4VG a las 16 horas de biotransformación, con un remanente de 3.6 mM de AF, que corresponden a una productividad de 0.30 mM/h, con un 76% de rendimiento molar de bioconversión (Figura 8B). A partir de las 16 h, la conversión del AF en 4VG quedó detenida, al igual que el consumo de AF, por lo que el porcentaje de consumo de AF fue del 64%. En la cinética de biotransformación con 15 mM de AF inicial, en donde se observó una producción mucho más lenta de 4VG, obteniendo un máximo de 4.7 mM de 4VG a las 24 horas de biotransformación, con un remanente de 11 mM de AF, que corresponden a 0.19 mM/h de productividad y un 76% de rendimiento molar, con un porcentaje de consumo de AF del 36% (Figura 8C).

Estos resultados sugieren que concentraciones cercanas a los 4.7- 4.9 mM de 4VG, ocasionan una inhibición por producto en el sistema de biotransformación con células en reposo. Ma y Daugulis (2014) reportaron que la biotransformación del AF es un mecanismo por el cual los microorganismos reducen la toxicidad del medio en el que se encuentran. Sin embargo, los intermediarios del proceso como la vainillina o el 4VG pueden ser inclusive más tóxicos que el AF, ocasionando una inhibición en el metabolismo microbiano.

Por otra parte, Lee et al. (1998), establecieron que la acumulación a una concentración superior de 2 mM de 4VG en el citoplasma de *Bacillus pumilus*, ocasiona una drástica disminución en la actividad de la descarboxilasa del AF, que es la enzima responsable de su biotransformación en 4VG.

En la cinética de biotransformación con 25 mM de AF (Figura 8D), se obtuvo una concentración máxima de 3.4 mM de 4VG a las 24 h de biotransformación y un 25% de consumo de AF, correspondientes a una productividad de 0.14 mM/h de 4VG, con un 49% de rendimiento molar. Los resultados muestran claramente que a medida que se incrementó la concentración de AF, la velocidad de bioconversión fue disminuyendo. Este hecho también indica un fenómeno de inhibición por sustrato del sistema.

La toxicidad del AF y sus derivados se ha correlacionado con la pérdida de la viabilidad de las células en los procesos de biotransformación (Ou y Kwok, 2004). Sin embargo, el efecto de estos compuestos fenólicos puede variar dependiendo del microorganismo empleado (Licandro-Seraut et al., 2013). Se ha reportado que las bacterias Gram positivas, tal es el caso de *Bacillus megaterium*, presentan una mayor pérdida de viabilidad si son sometidas a concentraciones superiores a 5 mM de AF (Sikkema et al., 1995). El AF al presentar una polaridad más baja en comparación a otros compuestos fenólicos, favorece su transporte a través del citoplasma y de la bicapa lipídica de la membrana. La acumulación del AF disminuye la permeabilidad de la membrana, ocasionando posteriormente su ruptura y la liberación del material intracelular (Borges et al., 2012).

Es por esto, que para evaluar procesos de biotransformación con una concentración igual o superior a 5 mM de AF, se han empleado sistemas de biocatálisis con el extracto de células lisadas o la enzima descarboxilasa del AF pura (Rosazza et al., 1995). Li et al. (2008), reportaron la producción de 2.55 mM de 4VG posterior a las 12 horas de biotransformación con el extracto crudo de la cepa *Enterobacter sp.* Px6-4 a una concentración inicial de 5 mM de AF. Mathew et al. (2007), evaluaron la biotransformación a una concentración inicial de 10 mM de AF con el extracto crudo de *Debaryomyces hansenii*, obteniendo una producción de 9.78 mM de 4VG a las 10 horas.

Por lo anterior se deduce que la implementación de sistemas de biocatálisis con extractos crudos o enzimas puras, permite incrementar la producción de 4VG en cortos periodos de tiempo. Sin embargo, se ha reportado que las células en reposo presentan una mayor estabilidad en la actividad enzimática en comparación a las células lisadas e inclusive enzimas puras. Otras de las ventajas de las células completas es que se evita la implementación de métodos costosos de purificación, y además las células pueden emplearse como biocatalizadores en múltiples procesos de biotransformación (Zhang et al., 2012; Forti et al, 2015).

El resumen comparativo entre los parámetros cinéticos para las diferentes concentraciones iniciales de AF en el sistema de células en reposo se muestra en la Figura 9.

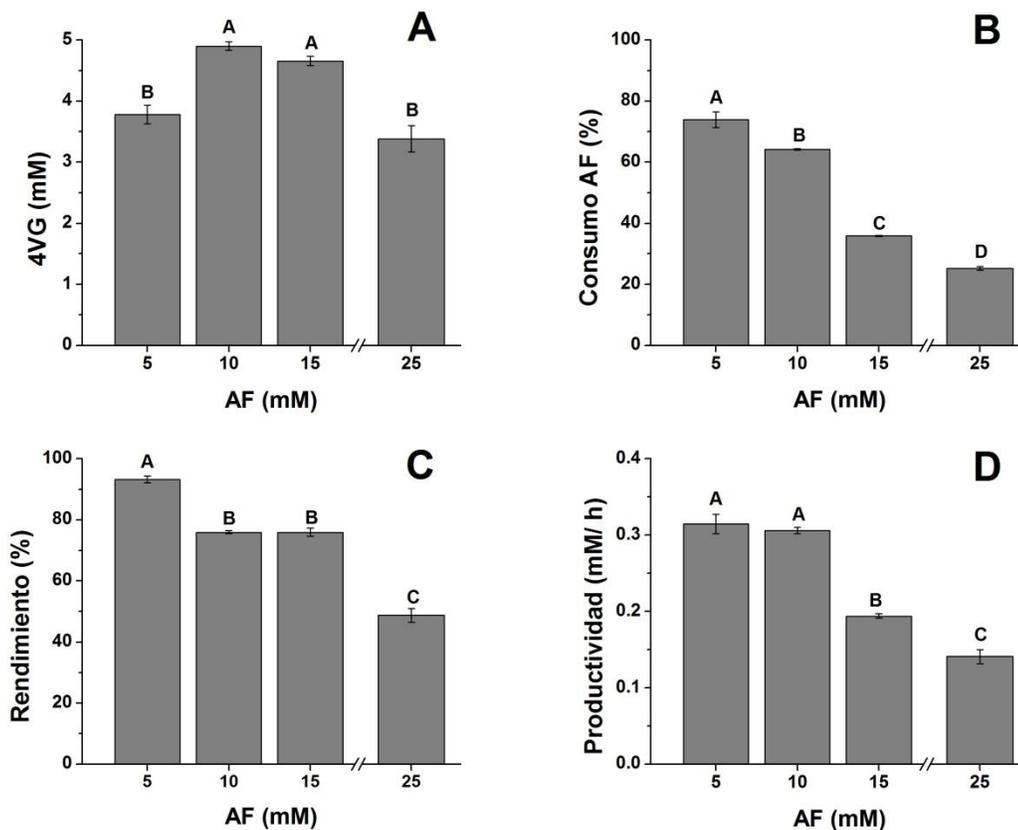


Figura 9. Parámetros cinéticos de biotransformación de AF puro con el sistema de células en reposo de *B. megaterium*. A) Producción máxima de 4VG (mM), B) Consumo molar de AF (%) a las 24 horas del proceso, C) Rendimiento molar producto-sustrato (%) y D) Productividad (mM/h). Diferente literal indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer.

Se observó un incremento en la concentración de 4VG hasta a un límite máximo de producción de 4.9 mM de 4VG con una concentración de 10 mM de AF ( $p < 0.05$ ). El incremento a una concentración de 25 mM de AF ocasiono una

disminución en la producción de 4VG debido a los fenómenos de inhibición tanto por sustrato como por producto anteriormente descritos (Figura 9A).

En los parámetros de consumo de AF y productividad (Figuras 9B y 9D respectivamente), la tendencia es muy similar observando una relación inversamente proporcional entre la concentración de AF y los valores de los parámetros analizados.

En el caso de los rendimientos (Figura 9C), a concentraciones entre 5 y 15 mM se alcanzaron rendimientos cercanos al 70%, teniendo una caída hasta de un 50% de rendimiento a la concentración de 25mM. Este comportamiento sugiere que el AF pudiera estar siendo empleado también como fuente de carbono para mantener la viabilidad de las células, debido al estado de latencia que presentan las células en reposo por la ausencia de una fuente de carbono de asimilación rápida.

### **6.2.2 Biotransformación de AF con Polvo Reconstituido y Nejayote Clarificado en un Sistema de Células en Crecimiento**

Se comparó el sistema de biotransformación de células en crecimiento en una solución reconstituida de nejayote en polvo con una concentración de 5.9 mM de AF y nejayote clarificado con una concentración de 5.3 mM de AF. Los cromatogramas correspondientes se presentan en la Figura 10. Mientras que en el sistema de células en crecimiento en la solución de polvo de nejayote reconstituido no se observó ni el consumo, ni la producción de 4VG (Figura 10A), en el sistema con nejayote clarificado se obtuvo una concentración de 2.13 mM de 4VG (Figura 10B), evidenciándose también el consumo de AF. En la Figura 10A se logra apreciar una serie de picos con un  $R_f$  inferior a los del AF, que por las características del método de HPTLC empleado, se tratarían de compuestos de mayor polaridad, posiblemente compuestos fenólicos glicosilados.

Coincidentemente con los cromatogramas, la diferencia entre la concentración de fenoles totales (establecida por el método de Folin-Ciocalteu) y la concentración de AF (establecida por HTPLC) es 24% más alta en la solución reconstituida de polvo de nejayote que en el nejayote clarificado (1.1 g/L y 0.74 g/L respectivamente). Este contenido más alto de otros compuestos de naturaleza fenólica puede deberse a cambios estructurales y formación de dímeros a temperaturas superiores a los 100 °C empleados en el secado por aspersión (Arrieta-Baez et al., 2012), y que al parecer la presencia de estos compuestos estaría ocasionando la inhibición del sistema de biotransformación.

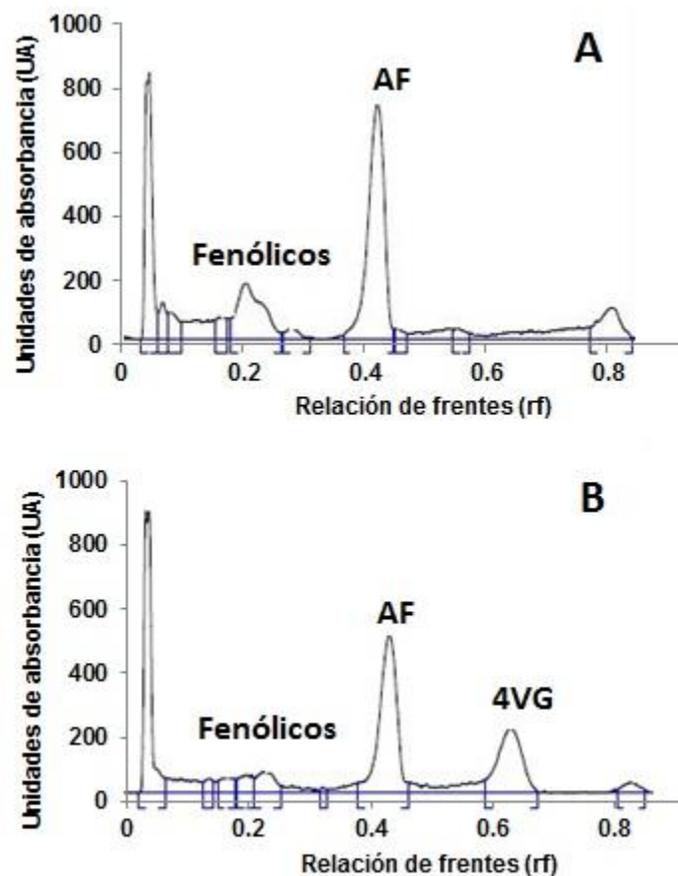


Figura 10. Biotransformación de AF a 4VG con: A) polvo de nejayote reconstituido y B) nejayote clarificado, con una cepa de *B. megaterium*.

En la Figura 11 se presenta la cromatoplaaca correspondiente de alícuotas de diferentes tiempos, de la solución reconstituida de polvo de nejayote reconstituido, conteniendo aproximadamente 5 mM de AF, incubada con la cepa de *B. megaterium*,

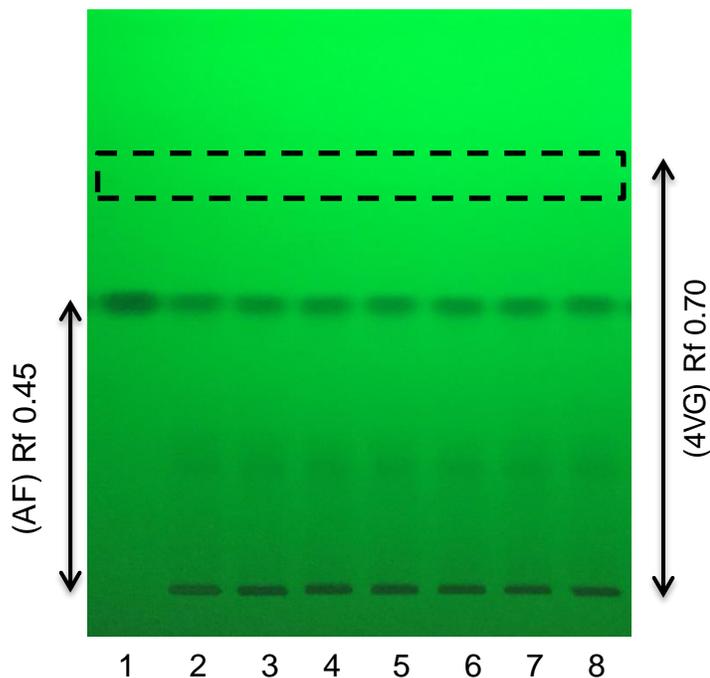


Figura 11. Cromatoplaaca de TLC de alícuotas de una solución de biotransformación de polvo de nejayote reconstituido. Carril 1: Estándar de AF; Carriles 2-8: hora 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 respectivamente.

La Figura 11 muestra claramente que no existieron cambios a lo largo del tiempo en la concentración del AF ya que las bandas correspondientes ( $R_f$  0.45) muestran la misma intensidad y tampoco se aprecia la aparición de alguna banda en la zona cercana a un  $R_f$  de 0.70, característico del 4VG. De acuerdo a esta técnica analítica, se confirma también la presencia de compuestos altamente polares y activos a la luz UV que no migran (permanecen en la zona de depósito) y otros que migran ligeramente y se encuentran distribuidos entre un  $R_f$  de 0.1 a 0.25, que podrían estar inhibiendo el sistema de biotransformación con células en crecimiento de *B. megaterium*.

### 6.2.3 Biotransformación de Nejayote Clarificado, Enriquecido con AF en un Sistema de Células en Crecimiento

Para evaluar el efecto de la concentración de compuestos fenólicos en los procesos de biotransformación de AF a 4VG sobre un fondo de carbohidratos y sales de calcio contenidos en el nejayote clarificado, se procedió a enriquecer el nejayote con AF puro (10, 15 y 25 mM AF), desarrollando el proceso de biotransformación en un sistema de células en crecimiento.

En la Figura 12 se muestran las cinéticas de crecimiento de *B. megaterium* en el nejayote enriquecido bajo las condiciones de 37 °C y 120 rpm.

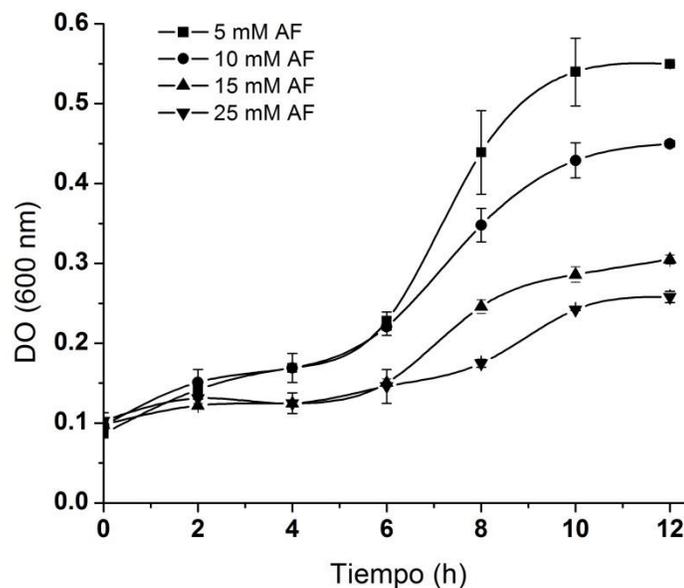


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de *Bacillus megaterium* en nejayote clarificado enriquecido con AF puro.

El crecimiento de *B. megaterium* en el sistema de biotransformación con nejayote enriquecido se vio limitado por las concentraciones de AF evaluadas. La fase lag de *Bacillus megaterium* tuvo una duración aproximada de 5 h a las concentraciones más bajas, de 6 h a la concentración de 15 mM de AF y de 8 h

a la concentración de 25 mM. En la Tabla 7 se presentan otros parámetros cinéticos de crecimiento de *Bacillus megaterium* en nejayote enriquecido. Se observa que la tasa específica de crecimiento máxima ( $\mu$  máx) fue en descenso a medida que se incrementó la concentración de AF, un fenómeno similar se observó con la biomasa máxima.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de crecimiento de *B. megaterium* en nejayote enriquecido.

	5 mM AF	10 mM AF	15 mM AF	25 mM AF
$\mu$ máx ( $\text{h}^{-1}$ )	$0.08 \pm 0.01^a$	$0.06 \pm 0.01^{a,b}$	$0.03 \pm 0.01^b$	$0.02 \pm 0.01^b$
<b>Biomasa</b>				
<b>máxima</b>	$4.84 \pm 0.06^a$	$4.03 \pm 0.02^b$	$2.92 \pm 0.04^c$	$2.55 \pm 0.05^d$
<b>(g/L)</b>				

Los datos se representan como la media  $\pm$  la desviación estándar de dos procesos experimentales independientes. Diferente literal en la misma línea indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de comparaciones de media de Tukey-Kramer.

Además de los mecanismos de inhibición del AF reportados anteriormente, Winlker y Kao (2011) observaron que una concentración igual o superior a 20 mM de AF ocasionan una inhibición en el crecimiento de *Lactobacillus brevis* por una represión en los genes que codifican proteínas asociadas al metabolismo de aminoácidos y carbohidratos, y proteínas implicadas en la división celular.

Por el contrario, se ha observado que concentraciones más bajas de AF que las evaluadas en el presente estudio, han causado una drástica reducción en la velocidad de crecimiento de las células de diversos microorganismos en procesos de biotransformación. Chai et al. (2013), reportaron una  $\mu$  de  $0.01 \text{ h}^{-1}$

aproximadamente, en un cultivo líquido de *Cupriavidus sp.* B-8 con una concentración de 1 mM de AF y la fase estacionaria se alcanzó a las 20 horas de cultivo. Campos et al. (2003) obtuvieron una  $\mu$  de  $0.02 \text{ h}^{-1}$  en un cultivo líquido de *Lactobacillus hildardii* a una concentración de 2.5 mM de AF; sin embargo, se observó que la fase estacionaria del cultivo se alcanzó a las 100 horas. Por el contrario, Stead (1993) reportó una completa inhibición en el crecimiento de *Lactobacillus brevis* y *Lactobacillus collinoides* en un cultivo líquido con una concentración de 5 mM de AF.

En la Figura 13 se muestran las cinéticas de biotransformación del AF a 4VG en nejayote enriquecido. La producción de 4VG con nejayote a 5 mM de AF se muestra en la Figura 13A. El consumo del AF presentó una caída exponencial a partir de las 6 horas hasta las 8 h de biotransformación, punto en el cual también se alcanzó la máxima concentración de 4VG de 2.11 mM, que corresponde a un rendimiento molar del 36% y una productividad de 0.264 mM/h.

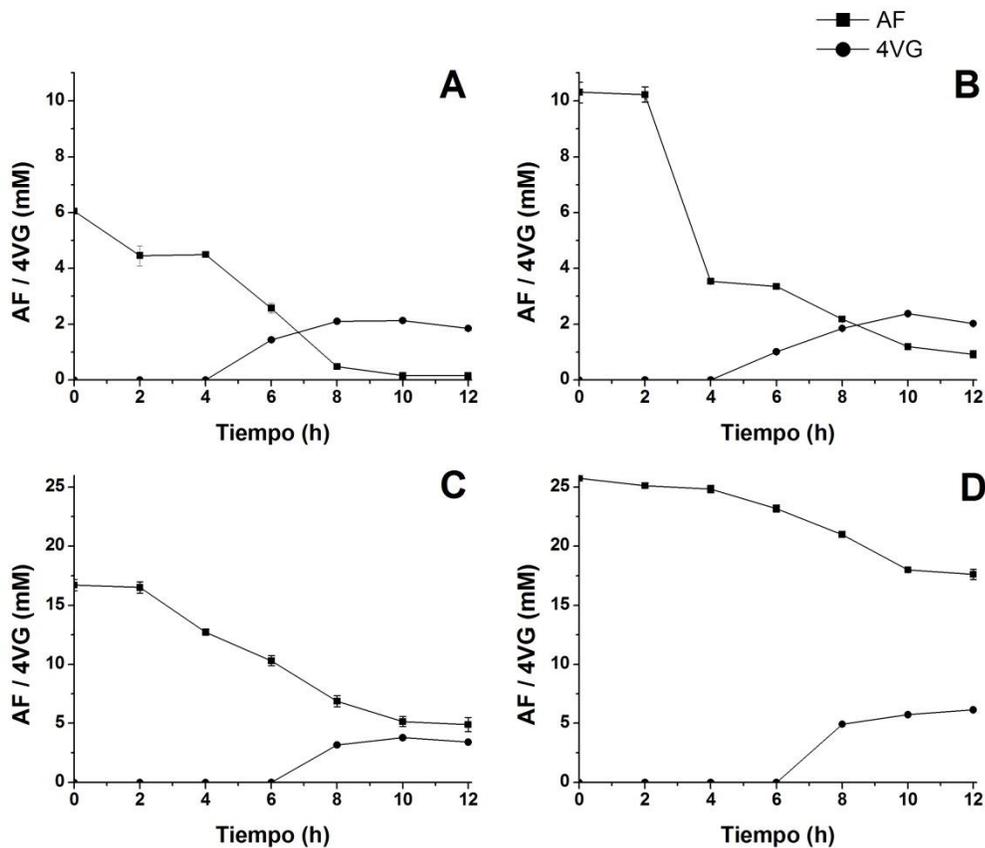


Figura 13. Cinéticas de biotransformación en un sistema de células en crecimiento de *B. megaterium* con nejayote clarificado A) 5 mM AF y con nejayote enriquecido a concentraciones de AF variables: B) 10 mM AF, C) 15 mM AF y D) 25 mM AF.

En la cinética de biotransformación con nejayote enriquecido a 10 mM de AF se observó un rápido consumo del AF posterior a las dos horas de biotransformación, para después disminuir gradualmente hasta las 10 horas, punto en el cual su consumo se detuvo y se alcanzó la máxima concentración de 2.38 mM de 4VG, que corresponde a un rendimiento molar de conversión del 26% y una productividad de 0.24 mM/ h (Figura 13B)

En el proceso de biotransformación a 15 mM de AF se presentó un descenso prácticamente lineal en la concentración de AF hasta las 10 horas de biotransformación, punto a partir del cual se mantuvo estacionaria. En este punto también se alcanzó el máximo de producción de 3.79 mM de 4VG,

correspondiente a una conversión molar del 33% y una productividad de 0.38 mM/ h (Figura 13C).

Cabe destacar, que en los procesos de biotransformación con 5, 10 y 15 mM de AF, se observó una disminución en la concentración de 4VG posterior a las 10 horas de cultivo. Esto sugiere que el 4VG puede ser metabolizado por las células en crecimiento de *Bacillus megaterium*. Sin embargo, no se identificó otro metabolito relacionado con la descarboxilación del AF, tal es el caso de la vainillina. Este fenómeno podría indicar que además del AF, el 4VG puede ser empleado como fuente de carbono en el metabolismo de *Bacillus megaterium*.

Un comportamiento diferente se observó en la biotransformación a 25 mM de AF, en donde se obtuvo una concentración de 6.13 mM de 4VG, correspondiente a un 75% de rendimiento molar de bioconversión y una productividad de 0.51 mM/ h. Contrario a lo observado en los otros procesos de biotransformación, no se presentó una disminución en la concentración de 4VG posterior a las 10 horas de cultivo, lo cual sugiere que la acumulación de 4VG a concentraciones mayores de 6 mM ocasiona una inhibición en el metabolismo de las células en crecimiento, evitando la degradación de 4VG (Figura 13D).

Diversos residuos agroindustriales de arroz, salvado de cereales y aceite de palma, que contienen concentraciones mucho menores a 5 mM de AF, han sido empleados principalmente como precursores para la producción de compuestos aromáticos de alto valor agregado como la vainillina (Zamzuri y Abd-Aziz, 2012). Específicamente para la producción del 4VG, Salgado et al. (2012), emplearon 1.54 mM de AF purificado a partir de residuos lignocelulósicos, en donde obtuvieron una productividad de 0.02 mM / h de 4VG en fermentación en estado sólido. Por lo tanto, el nejayote enriquecido presenta un potencial para el crecimiento de células de *B. megaterium* y la producción biotecnológica de 4VG en cortos periodos de tiempo.

Se realizó un resumen comparativo de los parámetros cinéticos del sistema de células en crecimiento para las diferentes concentraciones iniciales de AF (Figura 14).

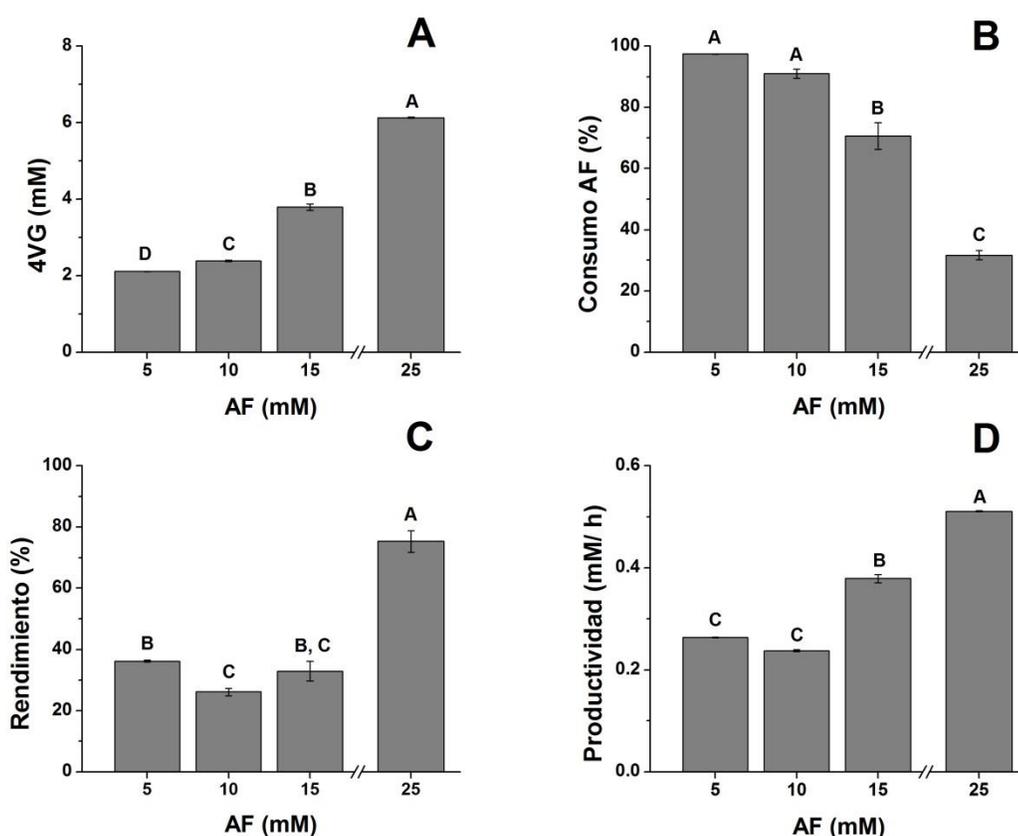


Figura 14. Parámetros cinéticos de biotransformación de nejayote enriquecido con AF, con el sistema de células en crecimiento de *Bacillus megaterium*. A) Producción de 4VG (mM), B) Consumo molar de AF (%), C) Rendimiento molar sustrato-producto (%) y D) Productividad (mM/h). Diferente literal indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de comparación de medias de Tukey-Kramer.

Contrariamente a lo observado en el sistema de células en reposo, se observó una relación directamente proporcional entre los parámetros referidos a la concentración máxima de 4VG, rendimiento y productividad (Figura 14A, 14C y 14D respectivamente) y la concentración de AF. Únicamente el porcentaje de

consumo de AF (Figura 14B), el comportamiento fue similar al del sistema de células en reposo, observando una relación inversamente proporcional.

Esta diferencia observada entre los sistemas de células en reposo y en crecimiento puede ser debido al estado metabólico en el que se encuentran las células de *B. megaterium*. Por un lado, la ausencia de fuentes de carbono de fácil asimilación y de nitrógeno en el sistema de células en reposo limita la generación de nuevas células. Adicionalmente, la concentración del AF y la acumulación de 4VG en este sistema ocasionan un estrés en la célula, pudiendo ocasionar una pérdida significativa de la viabilidad. Por el contrario, el nejayote empleado como medio de cultivo, aporta carbohidratos de fácil asimilación a las células en crecimiento de *Bacillus megaterium*. Esto permitiría disminuir el estrés generado por la presencia de los compuestos fenólicos, obteniendo una mayor producción de 4VG.

Sin embargo, la concentración de 6 mM de 4VG producida ocasionó una inhibición en el metabolismo de *Bacillus megaterium*, evitando el consumo del 4VG como fuente de carbono para el crecimiento de las células. La pérdida de viabilidad ocasionada por la inhibición del metabolismo, pudo ocasionar que la cepa de *Bacillus megaterium* actuara como un biocatalizador de célula completa y de esta forma incrementara la producción de 4VG, alcanzando la productividad más alta (0.51 mM/ h de 4VG) ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en el presente estudio se compararon con lo reportado para otros microorganismos en sistemas de células en crecimiento (Tabla 8)

Tabla 8. Biotransformación del AF a 4VG en sistemas de células viables.

Microorganismo	AF (mM)	4VG (mM)	Y p/s (%)	Productividad (mM/ h)	Referencia
<i>Bacillus coagulans</i>	5	6	120	0.86	Karmakar et al., (2000)
<i>Aspergillus niger</i> DAR2	4.11	1.6	60	0.013	Baqueiro-Peña et al., (2010)
<i>Lactobacillus farciminis</i>	0.26	0.06	15	0.001	Adamu et al., (2012)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	5.6	112	0.07	Hunter et al., (2012)
<i>Streptomyces setonii</i>	5	5.9	118	0.46	Max et al., (2012)
<i>Bacillus megaterium</i> (reposo)	5	3.8	93	0.32	Presente estudio (2016)
<i>Bacillus megaterium</i> (crecimiento)	25	6.12	75	0.51	

Diversos estudios con bacterias, tales como *Bacillus coagulans*, *Enterobacter aerogenes* y *Streptomyces setonii* han reportado rendimientos de bioconversión del AF mayores al 100% (Karkamar et al., 2000; Hunter et al., 2012; Max et al., 2012). Sin embargo, de acuerdo a la relación estequiométrica de la reacción de la descarboxilación del AF, la producción de 4VG y la productividad reportada en estos estudios se encuentran sobreestimadas. Esto

debido posiblemente por un error en la cuantificación del 4VG ocasionado por la degradación del estándar comercial del 4VG, tal como se pudo comprobar en el presente trabajo (datos no reportados). Pese a que dichos resultados resultan poco confiables, en la Tabla 7 se observa que únicamente la cepa de *B. coagulans* (Karmakar et al., 2000), tendría una productividad mayor a la obtenida en el presente estudio, aunque la mayor concentración de 4VG alcanzada es la que se reporta en este trabajo de tesis.

#### **6.2.4 Conclusiones**

Los CF diferentes al AF a una concentración de 1.087 g/L o superior contenidos en el polvo deshidratado de nejayote, ocasionaron una completa inhibición en el sistema de biotransformación con células en crecimiento de *Bacillus megaterium*.

Se presentaron diferencias en la eficiencia de la biotransformación del AF a 4VG dependiendo del estado metabólico de las células de *Bacillus megaterium*. El sistema de células en reposo de *Bacillus megaterium* resulto más eficiente en la bioconversión a 4VG con una concentración inicial de 5 mM de AF puro. Así mismo, las células en crecimiento presentaron una mayor eficiencia de biotransformación con nejayote clarificado, enriquecido a una concentración de 25 mM de AF.

En ambos sistemas de biotransformación, el AF a concentraciones mayores de 10 mM ocasiona una inhibición por sustrato. Mientras que el 4-vinilguayacol muestra una inhibición por producto más drástica que el ácido ferúlico.

## 6.2.5 Recomendaciones y Perspectivas

- 1.- Caracterizar e identificar los compuestos fenólicos diferentes al AF contenidos en el polvo deshidratado de nejayote.
- 2.- Establecer métodos de remoción de los compuestos fenólicos diferentes al AF para disminuir el fenómeno de inhibición en el sistema de biotransformación con células en crecimiento.
- 3.- Implementar un sistema de biocatálisis con células completas de *Bacillus megaterium* para reducir el fenómeno de inhibición por sustrato y por producto.

### 6.3 Sistema de Biocatálisis con Células Completas de *B. megaterium* para la Descarboxilación de AF

#### 6.3.1 Descarboxilación del AF en un Sistema de Biocatálisis con Células Completas de *Bacillus megaterium*

Se evaluó la descarboxilación del AF a una concentración de 5 mM en un sistema de biocatálisis con células completas. Como se muestra en la Figura 15 el sobrenadante del sistema de biocatálisis mostró cambios en el patrón de absorción UV a lo largo del tiempo. La descarboxilación del AF conduce a un cambio hipocrómico en los máximos de absorción del AF ( $\lambda$  max: 290 y 320 nm) al 4-vinilguayacol que presenta un máximo de absorción de 254 nm. Al inicio del proceso se presenta el espectro característico del AF, mientras que a las 9 horas el espectro es muy similar al del 4VG, infiriendo que se tuvo un alto grado de conversión.

Un análisis por HPTLC de las alícuotas mostró que efectivamente, la conversión molar del AF fue del 94%. Este resultado mostró un incremento del 18% de la eficiencia de conversión molar en relación con el sistema de biotransformación con células viables, el cual presentó un 76% de conversión molar del AF a las

12 horas. En términos de productividad no se presentaron diferencias, el sistema de biocatálisis con células completas alcanzó valores de 0.37 mM/h, mientras que el sistema de bioconversión 0.32 mM/h.

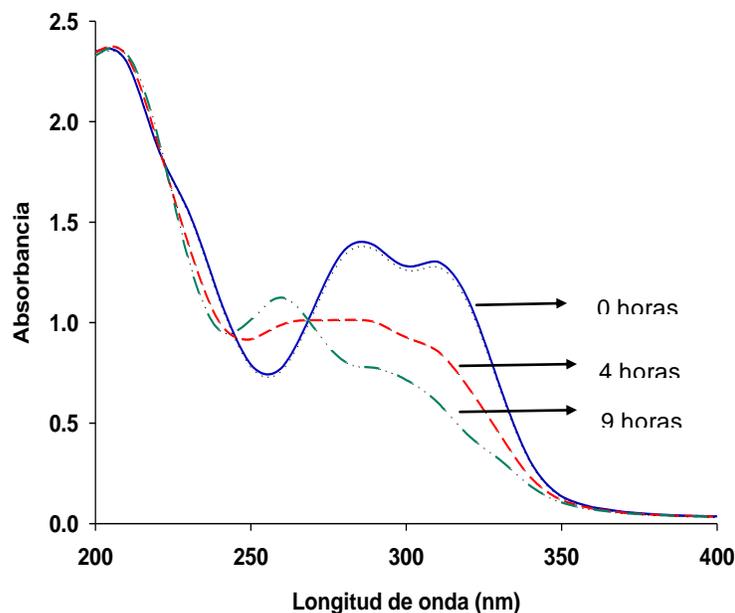


Figura 15. Descarboxilación del AF para la producción de 4VG en un sistema biocatálisis de células completas de *Bacillus megaterium*.

De acuerdo a los resultados obtenidos con el AF, se evaluó también el sistema de biocatálisis en la descarboxilación de otros ácidos hidroxicinámicos como los ácidos *o*-cumárico, *m*-cumárico, *p*-cumárico, cafeico; sinápico, y cinámico (Figura 16). Se observó una mayor eficiencia en la descarboxilación del ácido pC (100%), seguido por el AF (87%) y por último el CF (19%), como se muestra en la Figura 17. Los derivados 4-vinilos obtenidos de la descarboxilación fueron el 4-vinilfenol, 4-vinilguayacol y el 4-vinilcatecol, respectivamente (Laforgue y Lonvaud-Funel, 2012). Los otros 4 ácidos no pudieron ser descarboxilados por sistema de biocatálisis empleado.

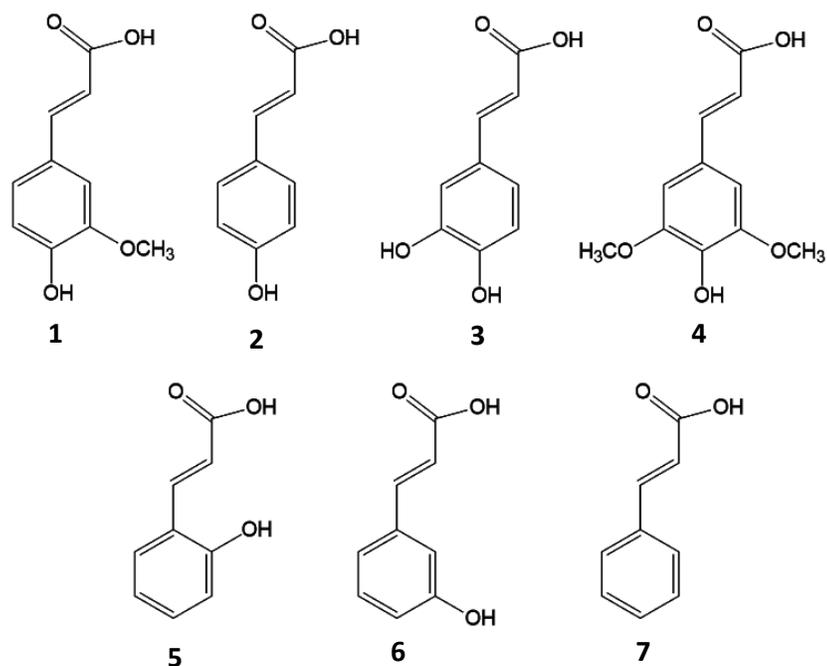


Figura 16. Estructura química de los ácidos hidroxicinámicos (AH). 1) ácido ferúlico (AF); 2) ácido *p*-cumárico (pC); 3) ácido cafeico (CF); 4) ácido sinápico (SP); 5) ácido *o*-cumárico (oC); 6) ácido *m*-cumárico (mC) y 7) ácido cinámico (CN).

La descarboxilación de los AH para la producción de los derivados 4-vinilos es llevada a cabo por la enzima descarboxilasa mediante una reacción catalítica estereoespecífica, en donde es indispensable la cadena lateral propenoide característica de los AH y un grupo hidroxilo en la posición *para* en la estructura del anillo aromático. Ambos grupos funcionales interactúan con el sitio de unión del sustrato de la enzima por medio de puentes de hidrogeno (Gu et al., 2011). Como se muestra en la Figura 16, de los siete AH evaluados en el presente estudio, solamente los AF (1), pC (2), CF (3) y SP (4) presentan un grupo hidroxilo en la posición *para* de la estructura del anillo bencénico. Sin embargo, no se presentó actividad descarboxilasa sobre el SP posiblemente por un impedimento estérico de la reacción por el grupo metoxilo en la posición 5 del anillo aromático. Nuevamente el caso del CN, la ausencia del grupo hidroxilo en

la posición *para*, sería la causante de la ausencia de la descarboxilación de este ácido.

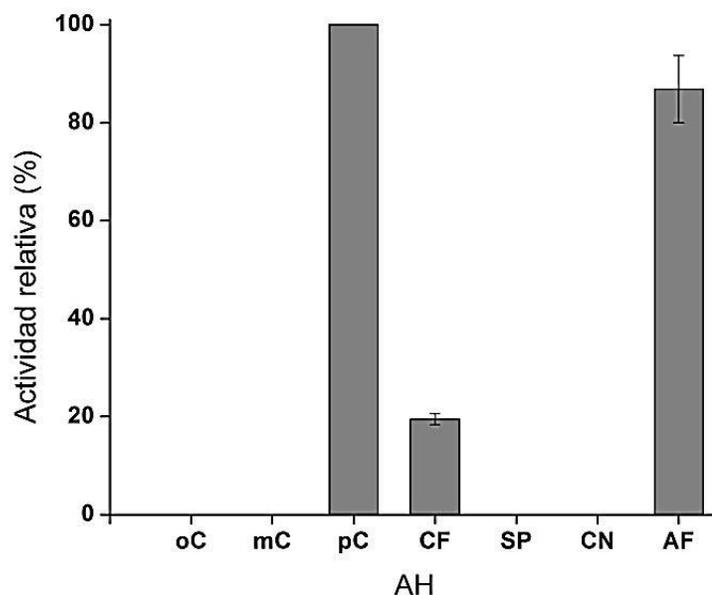


Figura 17. Actividad descarboxilasa de las células completas de *Bacillus megaterium* sobre los ácidos hidroxicinámicos (AH); ácido *o*-cumárico (oC); ácido *m*-cumárico (mC); ácido *p*-cumárico (pC); ácido cafeico (CF); ácido sinápico (SP); ácido cinámico (CN); ácido ferúlico (AF) a una concentración 2.5 mM.

La descarboxilación de los AH para la producción de los derivados 4-vinilos es llevada a cabo por la enzima descarboxilasa mediante una reacción catalítica estereoespecífico. En donde, es indispensable la cadena lateral propenoide característico de los AH y un grupo hidroxilo en la posición *para* en la estructura del anillo aromático. Ambos grupos funcionales interactúan con el sitio de unión del sustrato de la enzima por medio de puentes de hidrogeno (Gu et al., 2011). Como se muestra en la Figura 16, de los siete AH evaluados en el presente estudio, solamente el AF (1), pC (2), CF (3) y SP (4) presentan un grupo hidroxilo en la posición *para* de la estructura del anillo bencénico. Sin embargo, no se presentó actividad descarboxilasa sobre el SP posiblemente por un

impedimento estérico por el grupo metoxilo en la posición 5 del anillo aromático. No se observó actividad descarboxilasa sobre oC (5), mC (6) y CN (7) debido a que en el caso del oC y el mC el grupo hidroxilo del anillo aromático se encuentra en posición orto y meta, respectivamente. Mientras que en el caso del CN, fue debido a la ausencia del grupo hidroxilo en el anillo bencénico.

Estos resultados sugieren que el crecimiento de *Bacillus megaterium* en el nejayote está relacionado con la capacidad de descarboxilar el ApC y el AF contenidos en el nejayote. Resultados similares han sido reportados anteriormente con la descarboxilasa pura de *Bacillus subtilis*, *Brettanomyces anomalus* y *Lactobacillus plantarum* (Cavin et al., 1998; Edlin et al., 1998; Rodríguez et al., 2008; Rivas et al., 2009). No obstante, en comparación a lo reportado en el presente estudio, la descarboxilasa de estos microorganismos presentó una mayor especificidad sobre CF, seguido del pC y por último el AF. Por otro lado, la descarboxilasa de *Bacillus pumilus* mostró una mayor actividad sobre el pC en comparación con el AF, aunque el CF no fue evaluado en el estudio realizado por Degraasi et al., (1995).

Li et al. (2008), reportaron que los microorganismos mencionados anteriormente presentan regiones de aminoácidos altamente conservadas en el sitio catalítico de la descarboxilasa que usa AH como sustrato, motivo por el cual comparten un mecanismo de catálisis muy similar, en donde el grupo hidroxilo en posición *para* de los AH es desprotonado para generar un flujo de electrones a través de la estructura fenólica. Posteriormente, se forma un centro nucleófilo en el grupo carboxilo de la cadena lateral propenoide de los AH para la formación de un intermediario quinoide. Este intermediario es rápidamente descarboxilado produciendo el derivado 4-vinilo y CO<sub>2</sub> (Lee et al., 2015).

Las regiones altamente conservadas y el mecanismo de catálisis común, sugieren estas descarboxilasas están involucradas en el proceso de desintoxicación general en las bacterias, que permite convertir compuestos fenólicos tóxicos a derivados de menor toxicidad (Prim et al., 2003). Con base en los resultados obtenidos en la descarboxilación de AH, la descarboxilasa de

*Bacillus megaterium* presenta un mecanismo de catálisis similar a lo descrito por Lee et al., (2015).

### **6.3.2 Selección de Parámetros Óptimos de Temperatura y pH para la Descarboxilación del AF**

Con el objetivo de desarrollar un sistema adecuado para la descarboxilación del AF, se evaluó el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad descarboxilasa de las células completas de *Bacillus megaterium*. (Figura 18). La temperatura óptima para la descarboxilación del AF se evaluó en un rango de 20°C a 70°C como se muestra en la Figura 18A. La actividad descarboxilasa incrementó casi de manera lineal a partir de los 20°C hasta alcanzar el máximo de actividad a una temperatura de 40°C, observando una drástica disminución de la actividad a temperaturas superiores a los 40°C.

La termoestabilidad se evaluó incubando el biocatalizador a 30 °C, 40°C y 50°C durante 4 horas y se midió la actividad residual. A pesar de que la temperatura óptima de la actividad descarboxilasa se determinó a 40 °C (Figura 18A), al momento de evaluar la termoestabilidad a esta temperatura, se presentó una disminución paulatina de la actividad, obteniendo un  $t_{1/2}$  de una hora (Figura 18B). Por otro lado, cuando la termoestabilidad se evaluó a 50°C, se observó una pérdida total de la actividad a los 15 minutos de incubación del biocatalizador, lo que no permitió determinar el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) (Figura 18B). Por el contrario, el biocatalizador mostró una mayor estabilidad a 30 °C, conservando el 87% de su actividad a las 4 horas de incubación, obteniendo un  $t_{1/2}$  de 8 horas (Figura 18B).

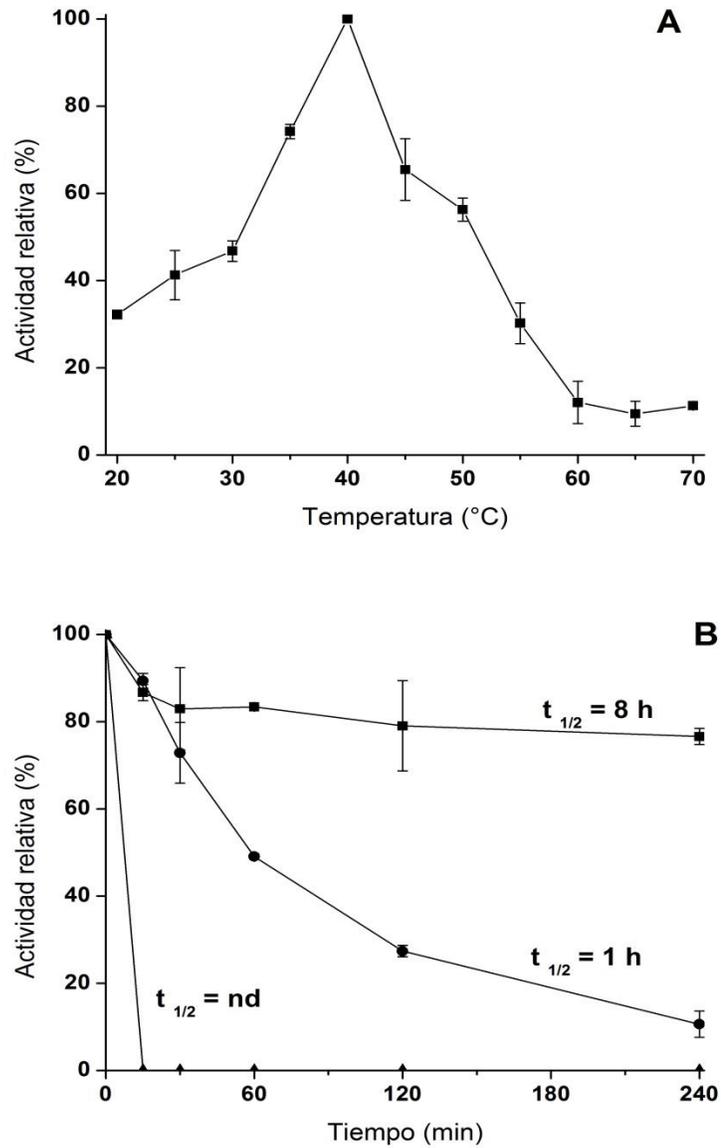


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad descarboxilasa del biocatalizador. A) Temperatura óptima de la actividad descarboxilasa y B) estabilidad térmica a 30°C (■), 40°C (●) y 50 °C (▲). \*nd = no determinada

Diversos reportes señalan que las descarboxilasas del AF puras de *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis*, presentan una temperatura óptima de 40 °C, que es similar a lo reportado en el presente estudio con la descarboxilasa de *Bacillus megaterium* (Degrassi et al., 1995; Cavin et al., 1998; Hu et al., 2015). Por el contrario, Landete et al. (2010), reportaron que la descarboxilasa de *Lactobacillus brevis* presentó una temperatura óptima de 22 °C. Las descarboxilasas de los microorganismos mencionados anteriormente muestran un 100% de actividad a 20 °C posteriores a 24 horas de incubación. Estos resultados sugieren que las descarboxilasas pertenecientes al género *Bacillus* son termolábiles a temperaturas superiores a los 30 °C.

La termoestabilidad de las proteínas ha sido asociada a su contenido de hélices  $\alpha$ . Un incremento en la cantidad de hélices  $\alpha$ , confiere una mayor estabilidad conformacional a la proteína brindando resistencia a altas temperaturas (Fimbres-García, 2016). A la fecha, son pocos los estudios en donde se reporta el modelo estructural de las descarboxilasas de AH, motivo por el cual se tomó como modelo de estudio la descarboxilasa de *Enterobacter sp.* Px64 reportada por Gu et al. 2011, la cual es altamente conservada en *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum* (Rodríguez et al., 2010). La estructura de esta proteína está compuesta por 9 láminas  $\beta$ , 2 hélices  $\alpha$  y 2 hélices  $\eta$ ; por lo que el contenido bajo de hélices  $\alpha$ , pudiera ocasionar la pérdida de estabilidad a temperaturas superiores de los 35 °C en las descarboxilasas.

El efecto del pH sobre la actividad descarboxilasa del biocatalizador se muestra en la Figura 19. El pH óptimo de la actividad se evaluó en un rango de pH 4 a pH 10 a 30 °C (Figura 19A). No se observó actividad enzimática del biocatalizador a pH 4, pero, el incremento del pH ocasionó un aumento de la actividad alcanzando el máximo a pH 5.5 posteriormente a partir del pH 6, se observó una disminución de la actividad de manera lineal conforme el valor de pH incrementaba. La actividad disminuyó hasta alcanzar valores de actividad relativa de 0%.

La triada catalítica de la descarboxilasa, que está altamente conservada en bacterias y está conformada por los aminoácidos tirosina, ácido glutámico y asparagina. Las propiedades de ionización de estos aminoácidos están directamente relacionadas con el pH del medio. El pH óptimo de la actividad de la descarboxilasa es de pH 5.5, debido a que en este pH la tirosina se encuentra ionizada y el ácido glutámico tiene carga neutra lo cual favorece la descarboxilación del AF, de acuerdo al mecanismo reportado por Gu et al., (2011).

Por otro lado, la estabilidad del biocatalizador se evaluó a los pH 5, 6 y 7, incubando el biocatalizador a una temperatura de 30 °C durante 4 horas. Contrario a lo esperado, se observó que con pH 5 y pH 6 se obtuvo un  $t_{1/2}$  de solo una hora, a pesar de que se presentó la mayor actividad descarboxilasa en este rango de pH (Figura 19B). La estabilidad de la proteína fue mayor a pH 7 en comparación con los pH 5 y 6, debido a que se mantuvo el 90% de la actividad a las 4 horas de incubación, obteniendo un  $t_{1/2}$  de 17 horas.

Esto puede ser debido a que a valor de pH menores a 7, las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos se ionizan generando repulsiones o atracciones de cargas que repercutirán directamente en la estructura, disminuyendo la actividad de la descarboxilasa.

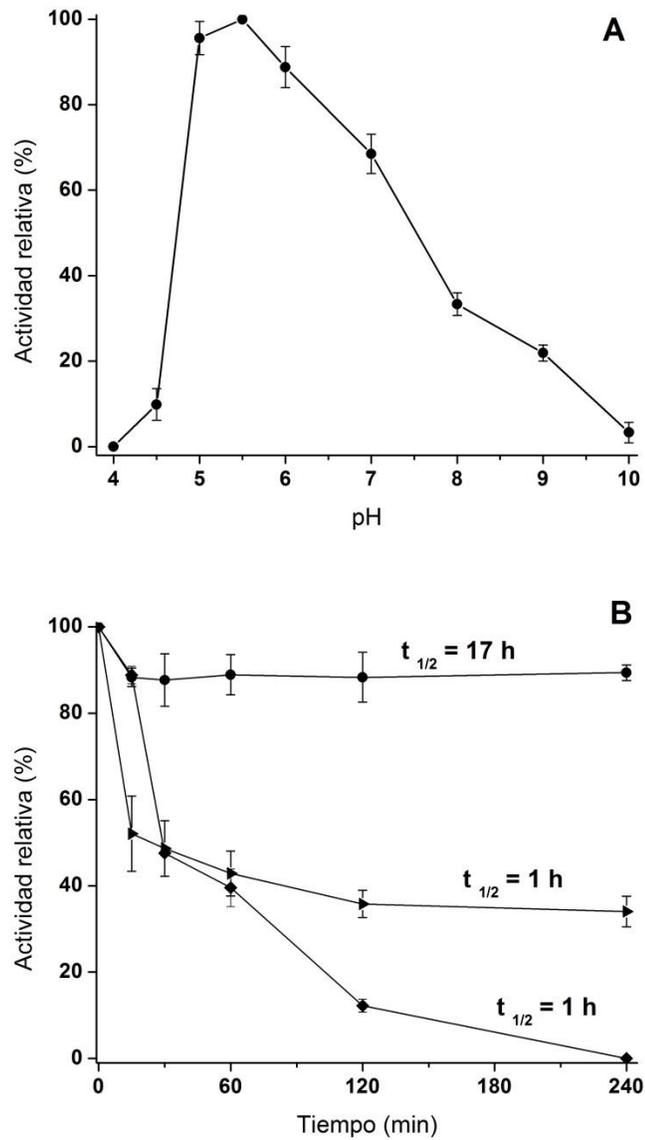


Figura 19. Efecto del pH sobre la actividad descarboxilasa del biocatalizador. A) pH óptimo de la actividad descarboxilasa y B) estabilidad a pH 5 (◆), 6 (▶) y 7 (●).

### 6.3.3 Sistema de Biocatálisis Monofásico de Células Completas con AF Puro y Nejayote Enriquecido

Se evaluó la eficiencia de descarboxilación del AF mediante un sistema biocatálisis monofásico de células completas de *B. megaterium* con AF puro en buffer de fosfatos 50 mM y con nejayote enriquecido a las concentraciones de 5, 10, 15 y 25 mM de AF. Los parámetros cinéticos de la descarboxilación del AF se analizaron y se compararon entre las diferentes concentraciones de AF como se muestra en la Figura 20.

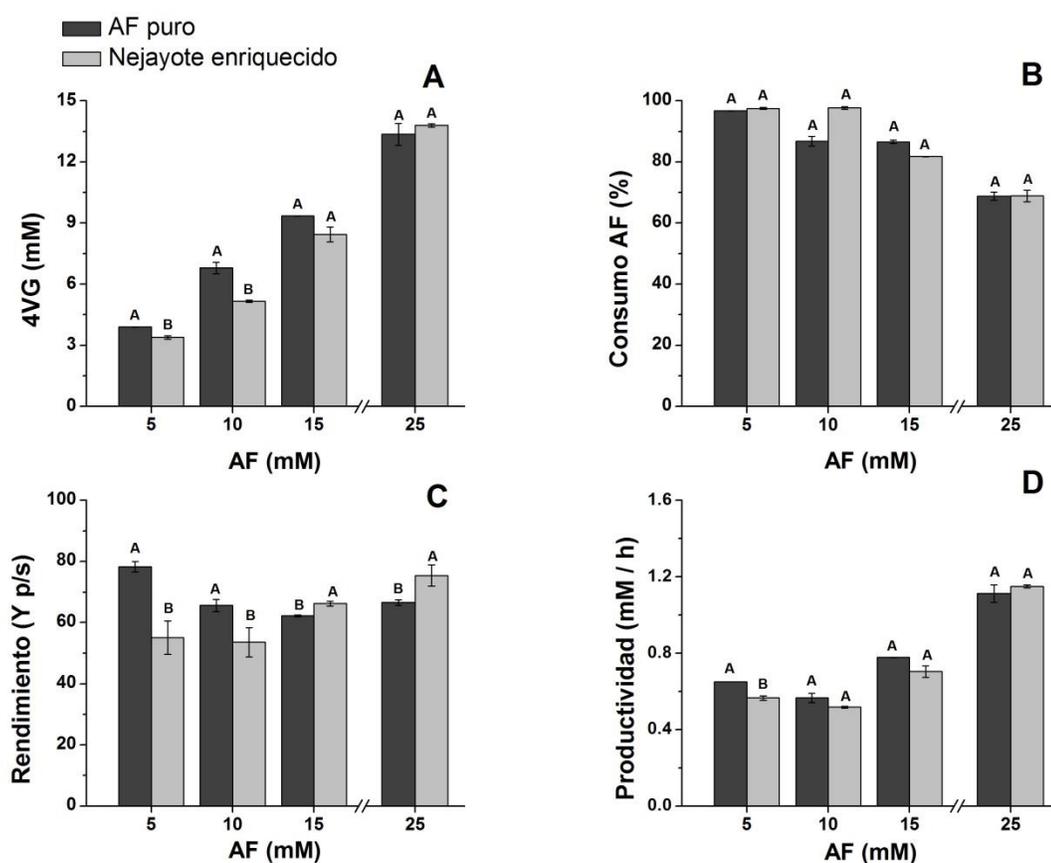


Figura 20. Parámetros cinéticos de descarboxilación con AF puro y nejayote enriquecido, en un sistema de células en reposo de *Bacillus megaterium*. A) Producción de 4VG, B) Consumo molar de AF (%), C) Rendimiento sustrato-producto y D) Productividad. Diferente literal en la misma concentración de AF evaluado, indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de t para muestras independientes.

En ambos procesos se observó un incremento en la producción de 4VG conforme se incrementó la concentración inicial de AF. No obstante, a una concentración de 5 y 10 mM de AF puro se observó una producción de 3.9 y 6.8 mM de 4VG, lo cual fue mayor a lo obtenido con nejayote ( $p < 0.05$ ). Por el contrario a concentraciones de 15 y 25 mM de AF no se observaron diferencias en la producción de 4VG con AF puro y nejayote ( $p > 0.05$ ). El máximo de producción con el sistema de células completas fue de 13.8 mM de 4VG con nejayote enriquecido a 25 mM de AF, lo cual es 2.25 veces mayor a lo obtenido con el sistema de células en crecimiento de *Bacillus megaterium* (6.12 mM de 4VG), que se presentó en la Sección 6.2.3 del presente estudio. Estos resultados demuestran que la implementación de un sistema de biocatálisis con células completas permitió incrementar la producción de 4VG (Figura 20A).

El porcentaje de consumo molar de AF en ambos procesos fue similar ( $p > 0.05$ ); aunque, se observó una ligera reducción conforme el incremento en la concentración del AF y por ende una mayor producción de 4VG (Figura 20B). Esto sugiere que la acumulación de 4VG ocasiona una inhibición por producto en la enzima descarboxilasa del AF. Este fenómeno fue reportado por Lee et al. (1998), quienes observaron una disminución lineal drástica de la actividad descarboxilasa de *Bacillus pumilus* como consecuencia de la acumulación de 4VG (1.66 mM) en un sistema de biocatálisis monofásico.

Por otro lado, el rendimiento molar de descarboxilación fue mayor con nejayote enriquecido a 15 y 25 mM de AF ( $p < 0.05$ ) en comparación con el AF puro, obteniendo un rendimiento del 66% y 75%, respectivamente (Figura 20C), lo cual podría ser atribuido a un incremento de la actividad descarboxilasa por los iones  $\text{Ca}^{+2}$  contenidos en el nejayote.

La productividad obtenida con AF puro y nejayote no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) cuando se compararon a la misma concentración. Con nejayote enriquecido a 25 mM de AF se obtuvo un máximo de productividad de 1.15 mM/ h (Figura 20D), lo cual es 3.6 veces mayor al rendimiento reportado

en el presente estudio con las células en reposo y 2.2 veces mayor respecto a las células en crecimiento de *Bacillus megaterium*.

Estos resultados demuestran que el sistema de células completas permite incrementar la producción de 4VG y la productividad en comparación con las células en reposo y en crecimiento. Sin embargo, se ha reportado que los procesos de biocatálisis con células completas son hasta 10 veces más lentos en comparación con enzimas purificadas o células lisadas. Esto debido a que la membrana celular de las bacterias Gram positivas limita la difusión del sustrato y producto, debido a su alta composición de peptidoglicano (Chen, 2007). Es por esto, que los procesos de biocatálisis de células completas han sido evaluados en sistemas bifásicos; en donde se emplea un solvente orgánico inmiscible con la fase acuosa. Los sistemas bifásicos permiten minimizar el tiempo de difusión del AF y el 4VG a través de la membrana, incrementando la productividad del sistema de biocatálisis (Wohlgemuth, 2010).

#### **6.3.4 Sistema de Biocatálisis Bifásico de Células Completas con Nejayote Enriquecido**

Para establecer un proceso de biocatálisis en un sistema bifásico adecuado, es necesario la selección de un solvente que permita la partición exclusiva del 4VG hacia la fase orgánica, además que el biocatalizador sea estable bajo estas condiciones. Estudios realizados por Lee et al. (1998), establecieron un sistema de biocatálisis bifásico, en donde seleccionaron hexano como fase orgánica debido a que las células completas de *Bacillus pumilus* mantuvieron en 50% la actividad descarboxilasa después de 24 horas de incubación. Además, observaron un coeficiente de partición alto del 4VG en comparación al AF.

Con base a lo anterior, se seleccionó al hexano como fase orgánica para la descarboxilación del AF con células completas de *Bacillus megaterium*. Se evaluó la estabilidad del biocatalizador en el sistema bifásico con buffer de fosfatos 50 Mm a pH 7 y como fase acuosa en una proporción 1:1 y se

determinó la actividad relativa residual del biocatalizador como se muestra en la Figura 21. Como control se empleó un sistema monofásico con buffer de fosfatos 50 mM que contenía AF a una concentración de 2.5 mM. Se observó una disminución del 20% en la actividad descarboxilasa del biocatalizador en el sistema monofásico posterior a los 30 minutos de incubación y esta se mantuvo constante hasta el término de la incubación (4 horas). Por el contrario, con el sistema bifásico se presentó un incremento del 50% de la actividad residual a las 4 horas de incubación del biocatalizador.

Estos resultados demuestran que el biocatalizador es más estable en un sistema bifásico e inclusive la actividad descarboxilasa aumenta en comparación con un sistema monofásico. Este comportamiento podría deberse a que los biocatalizadores de células completas del genero *Bacillus* han demostrado poseer una mayor estabilidad en sistemas bifásicos con solventes hidrofóbicos que presentan un valor de coeficiente de reparto (Log P ) entre 2.7 y 4; como el hexano, tolueno, isooctano y ciclohexano (Ben-Bassat et al., 2007 Jung et al., 2013; Hu et al., 2015).

Se ha reportado que los solventes que tienen un valor de Log P entre 2 y 5 tienen una mayor toxicidad sobre células viables, debido a que solubilizan los lípidos presentes en la membrana e inactivan proteínas de transporte y señalización (Heipieper et al., 1994). Sin embargo, esto puede ser una clara ventaja en sistemas de biocatálisis donde se emplean células sin viabilidad, ya que la permeabilidad de la membrana permite incrementar la velocidad de reacción de descarboxilación al favorecer la difusividad del sustrato y producto hacia el interior y exterior de la célula (León et al., 1998). Además, las enzimas son relativamente más estables en los sistemas bifásicos, ya que el contacto con el solvente orgánico es mínimo (Doukyu y Ogino, 2009).

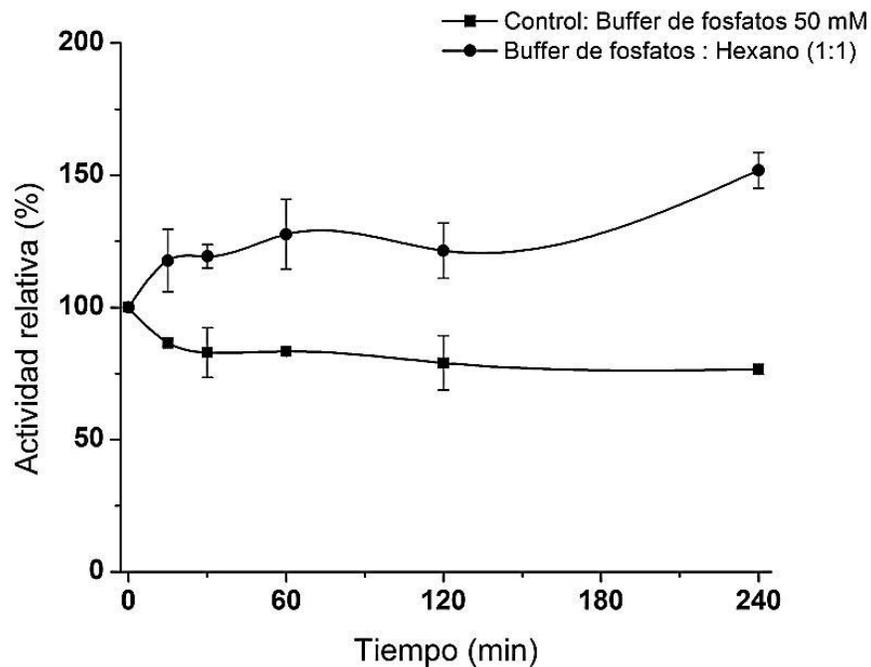


Figura 21. Estabilidad del biocatalizador en un sistema bifásico con buffer de fosfatos 50 mM como fase acuosa y hexano como fase orgánica, en proporciones iguales.

El sistema bifásico se evaluó con nejayote enriquecido a diferentes concentraciones de AF (5, 10, 15 y 25 mM) (Figura 22). Se puede apreciar como al implementar un sistema de biocatálisis bifásico se presentó un aumento en la producción de 4VG ( $p < 0.05$ ). La concentración máxima de 4VG obtenida fue de 16.4 mM, con nejayote enriquecido a 25 mM de AF (Figura 22A). Adicionalmente, se observó un incremento drástico en la productividad con el sistema de biocatálisis bifásico ( $p < 0.05$ ), obteniendo 4.11 mM/h de 4VG a una concentración de 25 mM de AF, lo cual es 3.57 veces mayor en comparación con el sistema monofásico a la misma concentración de AF (1.15 mM/h) (Figura 22B).

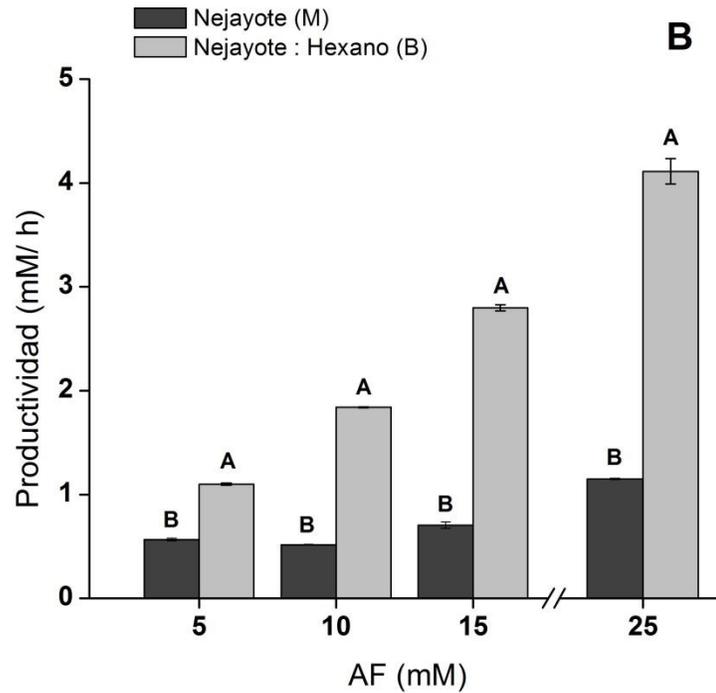
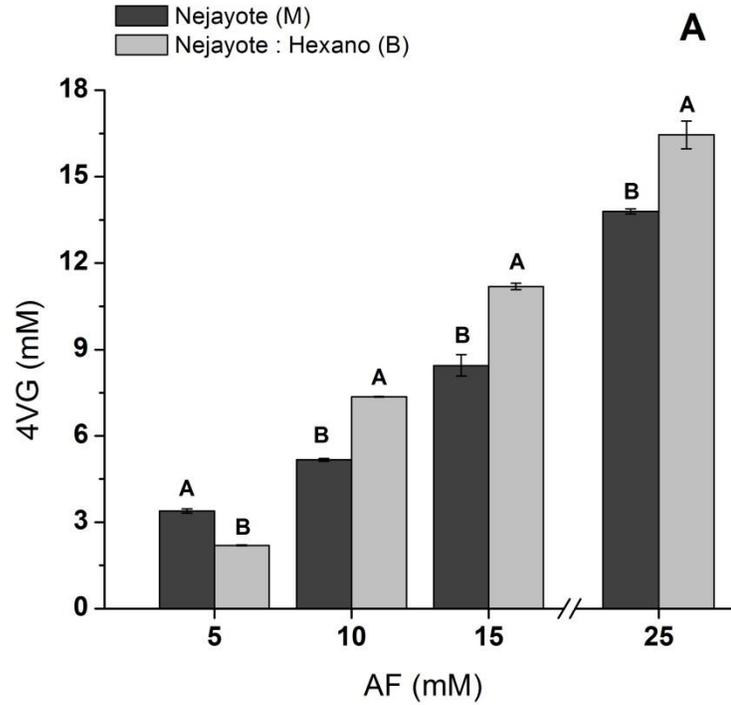


Figura 22. Producción y productividad de 4VG del sistema de biocatálisis monofásico (Nejayote) y bifásico (Nejayote: Hexano). A) Producción de 4VG y B) Productividad. Diferente literal en la misma concentración de AF evaluado, indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) de acuerdo a la prueba de t para muestras independientes.

De acuerdo a los buenos resultados obtenidos con el sistema bifásico, se evaluaron concentraciones de 50, 100 y 500 mM de AF, con las que se alcanzaron concentraciones máximas de 34.4, 62.2 y 48.11 mM de 4VG respectivamente (Figura 23A). A su vez, las productividades obtenidas con las concentraciones mencionadas fueron 5.9, 10.36 y 8 mM/ h, respectivamente (Figura 23B). Con base a la producción de 4VG y la productividad obtenida, se observó que aparentemente a partir de concentraciones de mayores a 100 mM de AF existe una inhibición por sustrato, aunque hace falta verificar el efecto de concentraciones en el rango de 100 a 500 mM para establecer de manera más precisa el punto de inflexión.

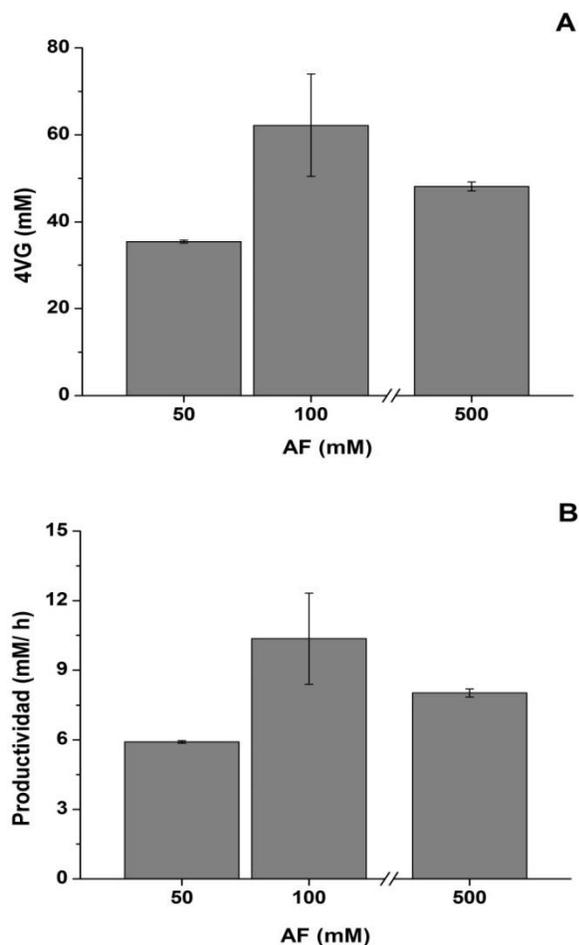


Figura 23. Descarboxilación del AF en un sistema de biocatálisis bifásico con nejayote enriquecido a concentraciones de 50, 100 y 500 mM de AF. A) Producción de 4VG y B) Productividad del 4VG.

En este estudio se exploraron 4 sistemas de biotransformación del ácido ferúlico con células de *Bacillus megaterium*. Los sistemas estudiados fueron un sistema de células en reposo, células en crecimiento, sistema de biocatálisis monofásico y sistema de biocatálisis bifásico. La comparación de los resultados más representativos de los 4 sistemas, tanto para la concentración de AF inicial, el 4VG generado y la productividad, se resumen en la Tabla 8.

La implementación de un sistema bifásico con células no viables, permitió emplear concentraciones de AF hasta 100 veces mayores en comparación con sistemas de células viables. Además, la producción de 4VG se incrementó 16 veces en comparación con las células en reposo y 10 veces con las células en crecimiento. La partición del 4VG a la fase orgánica conllevó a un aumento de alrededor de 4 veces la producción de 4VG en comparación con el sistema monofásico (Tabla 9).

La productividad con el sistema de biocatálisis bifásico presentó un incremento de alrededor de 32 veces en comparación con el sistema de células en reposo y 20 veces cuando se usaron células en crecimiento. Inclusive comparando sistemas de biocatálisis, la partición del 4VG de la fase acuosa, permitió incrementar 9 veces la productividad de 4VG.

Lee et al. (1998), con un sistema bifásico de células completas de *Bacillus pumilus*, empleando una concentración de 83 mM de AF, reportaron una producción de 51 mM de 4VG y una productividad de 23.4 mM/ h, la cual es aproximadamente 2 veces superior a la máxima productividad obtenida en el presente estudio (10.36 mM/ h).

Por otro lado, Hu et al. (2015) con una concentración inicial de 100 mM de AF, reportaron una producción de 99 mM de 4VG con una descarboxilasa sobreexpresada de *Bacillus licheniformis*. A pesar de que la producción de 4VG es 38% más alta a la que se alcanzó con el sistema de biocatálisis bifásico de *Bacillus megaterium*.

Un factor que es importante destacar, es que los productos obtenidos por la biotransformación de microorganismos modificados genéticamente, en este caso la enzimas sobreexpresadas en *E. coli*, no pueden ser denominados productos de origen natural de acuerdo a las legislaciones europeas, lo que representa una enorme desventaja para la implementación de un proceso industrial para la comercialización del 4VG en la industria alimentaria.

Tabla 9. Comparación en la producción y productividad de 4VG en los sistemas evaluados.

<b>Sistema (Células de <i>B. megaterium</i>)</b>	<b>AF inicial (mM)</b>	<b>Producción de 4VG (mM)</b>	<b>Productividad (mM/ h)</b>
Reposo	25	3.8	0.32
Crecimiento	25	6.12	0.51
Completas (monofásico)	25	13.8	1.15
Completas (bifásico)	100	62	10.36

### **6.3.5 Producción de 4VG a partir de AF Parcialmente Purificado de Polvo Deshidratado de Nejayote**

Una vez establecido el mejor sistema de producción de 4VG, se evaluó la descarboxilación del AF en el sistema bifásico con el AF purificado parcialmente del polvo deshidratado de nejayote, a una concentración equivalente de 100 mM de AF y una concentración de fenoles totales de 9 g/L. Se obtuvieron cristales de AF con un 70% de pureza y los 30% restantes se atribuyeron a compuestos fenólicos glicosilados.

Con el sistema bifásico empleando el AF parcialmente purificado se obtuvo una producción de 13.31 mM de 4VG, aproximadamente 5 veces menor en relación al sistema bifásico que empleó una solución de AF ferúlico puro a la misma concentración inicial (100 mM). Esta gran disminución en la conversión pone nuevamente de manifiesto el fuerte efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos, diferentes al AF, posiblemente compuestos fenólicos glicosilados. Este hecho ratifica la necesidad de lograr una mayor purificación del AF contenido en el polvo deshidratado de nejayote para lograr buenos rendimientos de 4VG.

### **6.3.6 Conclusión**

El sistema de biocatálisis empleando células completas de *Bacillus megaterium* (sin viabilidad) es un sistema más eficiente para la producción de 4VG a partir de AF en comparación con los sistemas de biotransformación con células en reposo y en crecimiento. Por otro lado, la implementación de un sistema bifásico (hexano: nejayote enriquecido) permite reducir el efecto de inhibición por producto ocasionado por el 4VG.

### **6.3.7 Recomendaciones y Perspectivas**

- 1.- Purificar y determinar las características bioquímicas y cinéticas de la descarboxilasa del AF de *Bacillus megaterium*.
- 2.- Desarrollar un método para la inmovilización de la enzima descarboxilasa del AF mediante el entrecruzamiento enzimático, que permita incrementar la termoestabilidad en el biocatalizador de células completas.
- 3.- Establecer un sistema de biocatálisis en modo de operación lote alimentado o continuo, con el objetivo de incrementar la producción de 4VG

## 7. CONCLUSIONES

El ácido ferúlico contenido junto con otras moléculas en un concentrado de nejayote parcialmente purificado, no puede ser biotransformado en 4-vinilguayacol con la misma eficiencia de procesos de biotransformación que emplean soluciones de ácido ferúlico puro, debido a que la descarboxilasa de *Bacillus megaterium* es inhibida por los compuestos fenólicos diferentes al AF.

## **8. RECOMENDACIONES**

Estudiar el potencial de uso del nejayote clarificado y el polvo deshidratado de nejayote como sustrato para la producción biotecnológica de otros compuestos aromáticos como la vainillina.

## REFERENCIAS

Adamu H. A., Iqbal S., Chan K. W. and Ismail M. 2012. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Lactobacillus farciminis*. African Journal of Biotechnology. 11(5): 1177-1184.

Alagappan G. and Cowan R. M. 2001. Biokinetic models for representing the complete inhibition of microbial activity at high substrate concentrations. Biotechnology and Bioengineering. 75(4): 393-405.

Alcón A. 2003. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: aplicación a la producción de xantano. Tesis de Doctorado en Ciencias, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis. Official Method 986.35, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Maryland, USA.

APHA. 1995. American Public Health Association. Official Method 2540D. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

Arrieta-Baez D., Dorantes-Álvarez L., Martínez-Torres R., Zepeda-Vallejo G., Jaramillo-Flores M. E., Ortiz-Moreno A. and Aparicio-Ozores G. 2012. Effect of thermal sterilization on ferulic, coumaric and cinnamic acids: Dimerization and antioxidant activity. Journal of the Science of Food and Agriculture. 92(13): 2715-2720.

Arsuaga J. M., López-Muñoz M. J. and Sotto A. 2010. Correlation between retention and adsorption of phenolic compounds in nanofiltration membranes. Desalination. 250(2): 829-832.

Asaff T. and Reyes V. 2013. Un método y un sistema para el tratamiento integral de aguas residuales de una industria del maíz. Solicitud de Patente Mexicana. No. MX/a/2013/002096.

Asaff T., M de la Torre M. and R Macías R. 2008. Proceso para la recuperación de ácido ferúlico. Patente Mexicana. No. MX259521.

Ashengroph M., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H. and Momenbeik F. 2012. Novel strain of *Bacillus licheniformis* SHL1 with potential converting ferulic acid into vanillic acid. *Annals of Microbiology*. 62(2): 553-558.

Ayala-Soto F. E., Serna-Saldívar S. O., García-Lara S. and Pérez-Carrillo E. 2014. Hydroxycinnamic acids, sugar composition and antioxidant capacity of arabinoxylans extracted from different maize fiber sources. *Food Hydrocolloids*. 35: 471-475.

Baker R. W. 2012. Overview of membrane science and technology. *Membrane Technology and Applications*. 3: 1-14.

Balasubashini M., Rukkumani R., Viswanathan P., and Menon V. P. 2004. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytotherapy Research*. 18(4): 310-314.

Baqueiro-Peña I., Rodríguez-Serrano G., González-Zamora E., Augur C., Loera O. and Saucedo-Castañeda G. 2010. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by a wild and a diploid strain of *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 101(12): 4721-4724.

Berlanga-Reyes C. M., Carvajal-Millán E., Lizardi-Mendoza J., Rascón-Chu A., Márquez-Escalante J. A. and Martínez-López, A. L. 2009. Maize arabinoxylan gels as protein delivery matrices. *Molecules*. 14(4):1475-1482.

Bernini R., Mincione E., Barontini M., Provenzano G. and Setti L. 2007. Obtaining 4-vinylphenols by decarboxylation of natural 4-hydroxycinnamic acids under microwave irradiation. *Tetrahedron*. 63(39): 9663-9667.

Bicas J. L., Silva J. C., Dionísio A. P. and Pastore G. M. 2010. Biotechnological production of bioflavors and functional sugars. *Food Science and Technology (Campinas)*. 30(1): 07-18.

Borges A., Saavedra M. J. and Simões M. 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*. 28(7): 755-767.

Camacho-Ruiz M. A., Camacho-Ruiz R. M., Armendáriz M., Ramírez-Velasco L., Asaff-Torres A., Levasseur, A. and Rodriguez J. A. 2016. Corn bran as potential substrate for high production of feruloyl and acetylxylan esterases by solid state fermentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 15(1): 11-21.

Campos F. M., Couto J. A. and Hoq T. A. 2003. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Journal of Applied Microbiology*. 94(2): 167-174.

Carvajal-Millán E., Landillon V., Morel M. H., Rouau X., Doublier J. L. and Micard V. 2005. Arabinoxylan gels: Impact of the feruloylation degree on their structure and properties. *Biomacromolecules*. 6(1): 309-317.

Carvajal-Millán E., Rascon-Chu A. and Márquez-Escalante J.A. 2005. Método para la obtención de goma de maíz a partir del líquido residual de la nixtamalización del grano de maíz. Patente Mexicana. PA/a/2005/008124.

Cassano A., Donato L., Conidi C. and Drioli E. 2008. Recovery of bioactive compounds in kiwifruit juice by ultrafiltration. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 9(4): 556-562.

Castro-Muñoz R., Cerón-Montes G. I., Barraquán-Huerta B. E. and Yáñez-Fernández J. 2015. Recovery of carbohydrates from nixtamalization wastewaters (nejayote) by ultrafiltration. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14(3): 735-744.

Cavin J. F., Dartois V. and Diviès C. 1998. Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(4): 1466-1471.

Chang I. S. and Kim S. N. 2005. Wastewater treatment using membrane filtration: effect of biosolids concentration on cake resistance. *Process Biochemistry*. 40(3): 1307-1314.

Chen R. R. 2007. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74(4): 730-738.

Cissé M., Vaillant F., Pallet D. and Dornier M. 2011. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Food Research International*. 44(9): 2607-2614.

Conidi C., Cassano A. and Garcia-Castello E. 2014. Valorization of artichoke wastewaters by integrated membrane process. *Water research*. 48, 363-374.  
Converti A., Aliakbarian B., Domínguez J. M., Vázquez G. B. and Perego P. 2010. Microbial production of biovanillin. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41(3): 519-530.

Cortés-Gómez A., San Martín-Martínez E., Martínez-Bustos F. and Vázquez-Carrillo G. M. 2005. Tortillas of blue maize (*Zea mays* L.) prepared by a fractionated process of nixtamalization: analysis using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 66(3): 273-281.

Council Directive 88/388/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. *Official J. Eur. Union L* 1988, 184, 61.

De Carvalho C. C. and Da Fonseca M. M. R. 2006. Biotransformation of terpenes. *Biotechnology Advances*. 24(2): 134-142.

De Jong J., Lammertink R. G. H. and Wessling M. 2006. Membranes and microfluidics: a review. *Lab on a Chip*. 6(9): 1125-1139.

De Grassi G., De Laureto P. P. and Bruschi C. V. 1995. Purification and characterization of ferulate and p-coumarate decarboxylase from *Bacillus pumilus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1): 326-332.

Doukyu N. and Ogino H. 2010. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*. 48(3): 270-282.

Edlin D. A., Narbad A., Gasson M. J., Dickinson J. R. and Lloyd D. 1998. Purification and characterization of hydroxycinnamate decarboxylase from *Brettanomyces anomalus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 22(4): 232-239.

Elimelech M., Zhu X., Childress A. E. and Hong S. 1997. Role of membrane surface morphology in colloidal fouling of cellulose acetate and composite aromatic polyamide reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science*. 127(1): 101-109.

Eppinger M., Bunk B., Johns M. A., Edirisinghe, J. N., Kutumbaka K. K., Koenig S. S. and Martin M. 2011. Genome sequences of the biotechnologically important *Bacillus megaterium* strains QM B1551 and DSM319. *Journal of Bacteriology*. 193(16): 4199-4213.

Fimbres-García D. 2016. Caracterización bioquímica y modelación estructural de la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) de mango (*Mangifera indica* L.) Maestría en Ciencias. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.

Forti L., Di Mauro S., Cramarossa M. R., Filippucci S., Turchetti B. and Buzzini P. 2015. Non-conventional yeasts whole cells as efficient biocatalysts for the production of flavors and fragrances. *Molecules*. 20(6): 10377-10398.

Fujioka K. and Shibamoto T. 2006. Quantitation of volatiles and nonvolatile acids in an extract from coffee beverages: correlation with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(16). 6054-6058.

Furuya T., Miura M., Kuroiwa M. and Kino K. 2015. High-yield production of vanillin from ferulic acid by a coenzyme-independent decarboxylase/oxygenase two-stage process. *New Biotechnology*. 32(3): 335-339.

Gallage N. J. and Møller B. L. 2015. Vanillin–bioconversion and bioengineering of the most popular plant flavor and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. *Molecular Plant*. 8(1): 40-57.

Garcia-Castello E., Cassano A., Criscuoli A., Conidi C. and Drioli E. 2010. Recovery and concentration of polyphenols from olive mill wastewaters by integrated membrane system. *Water Research*. 44(13): 3883-3892.

Goldberg R. N., Lang B. E., Selig M. J. and Decker S. R. 2011. A calorimetric and equilibrium investigation of the reaction {methyl ferulate (aq)+ H<sub>2</sub>O (l)= methanol (aq)+ ferulic acid (aq)}. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. 43(3): 235-239.

Gounaris Y. 2010. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 25(5): 367-386.

Gu W., Yang J., Lou Z., Liang L., Sun Y., Huang J. and Zhang K. Q. 2011. Structural basis of enzymatic activity for the ferulic acid decarboxylase (FADase) from *Enterobacter* sp. Px6-4. *PLoS One*. 6(1); e16262.

Gustalli A. 2006. Estudio sobre la aplicación de la tecnología de membranas para la recuperación del ácido fosfórico de las aguas de lavado en el proceso de anodizado del aluminio. Tesis de doctorado. Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

Gutiérrez-Urbe J. A., Rojas-García C., García-Lara S. and Serna-Saldivar S. O. 2010. Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *Journal of Cereal Science*. 52(3): 410-416.

Gutiérrez-Urbe J. A., Rojas-García C., García-Lara S. and Serna-Saldivar S. O. 2010. Phytochemical analysis of wastewater (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. *Journal of Cereal Science*. 52(3): 410-416.

Harris P. J. and Trethewey J. A. 2010. The distribution of ester-linked ferulic acid in the cell walls of angiosperms. *Phytochemistry Reviews*. 9(1): 19-33.

Heipieper H. J., Weber F. J., Sikkema J., Keweloh H. and de Bont J. A. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*. 12(10): 409-415.

Hu H., Li L. and Ding S. 2015. An organic solvent-tolerant phenolic acid decarboxylase from *Bacillus licheniformis* for the efficient bioconversion of hydroxycinnamic acids to vinyl phenol derivatives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 99(12): 5071-5081.

Hunter W. J., Manter D. K., and van der Lelie D. 2012. Biotransformation of ferulic acid to 4-vinylquaiacol by *Enterobacter soli* and *E. aerogenes*. *Current Microbiology*. 65(6): 752-757.

Ignacio-Pacheco M. 2015. Obtención de ácido ferúlico a partir de un concentrado de la hidrólisis alcalina del maíz. Maestría en Ciencias. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.

Ishige T., Honda K. and Shimizu S. 2005. Whole organism biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 9(2): 174-180.

Jeong J. B. and Jeong H. J. 2010. 2-Methoxy-4-vinylphenol can induce cell cycle arrest by blocking the hyper-phosphorylation of retinoblastoma protein in

benzo [a] pyrene-treated NIH3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 400(4): 752-757.

Julsing M. K., Kuhn D., Schmid A. and Bühler B. 2012. Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnology and Bioengineering*. 109(5): 1109-1119.

Jung D. H., Choi W., Choi K. Y., Jung E., Yun H., Kazlauskas R. J. and Kim, B. G. 2013. Bioconversion of p-coumaric acid to p-hydroxystyrene using phenolic acid decarboxylase from *B. amyloliquefaciens* in biphasic reaction system. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 97(4): 1501-1511.

Karmakar B., Vohra R. M., Nandanwar H., Sharma P., Gupta K. G. and Sobti R. C. 2000. Rapid degradation of ferulic acid via 4-vinylguaiacol and vanillin by a newly isolated strain of *Bacillus coagulans*. *Journal of Biotechnology*. 80(3): 195-202.

Kaur B. and Chakraborty D. 2013. Biotechnological and molecular approaches for vanillin production: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 169(4): 1353-1372.

Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K. and Taniguchi H. 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(7): 2161-2168.

Klibanov A. M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 409(6817): 241-246.

Korneli C., David F., Biedendieck R., Jahn D. and Wittmann C. 2013. Getting the big beast to work—systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. *Journal of Biotechnology*. 163(2): 87-96.

Kumar N. and Pruthi V. 2014. Potential applications of ferulic acid from natural sources. *Biotechnology Reports*. 4: 86-93.

Laforque R. and Lonvaud-Funel A. 2012. Hydroxycinnamic acid decarboxylase activity of *Brettanomyces bruxellensis* involved in volatile phenol production: relationship with cell viability. *Food Microbiology*. 32(2): 230-234.

Landete J. M., Rodríguez H., Curiel J. A., de las Rivas B., Mancheño J. M. and Muñoz R. 2010. Gene cloning, expression, and characterization of phenolic acid

decarboxylase from *Lactobacillus brevis* RM84. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 37(6): 617-624.

Langos D., Granvogl M. and Schieberle P. 2013. Characterization of the key aroma compounds in two Bavarian wheat beers by means of the sensomics approach. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 61(47): 11303-11311.

Lee H., Park J., Jung C., Han D., Seo J., Ahn J. H. and Hur H. G. 2015. Enhancement of the catalytic activity of ferulic acid decarboxylase from *Enterobacter sp.* Px6-4 through random and site-directed mutagenesis. Applied Microbiology and Biotechnology. 99(22): 9473-9481.

Lee I. Y., Volm T. G. and Rosazza J. P. 1998. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol by *Bacillus pumilus* in aqueous-organic solvent two-phase systems. Enzyme and Microbial Technology. 23(3): 261-266.

Lee S. H. and Lee S. B. 2009. Octanol/water partition coefficients of ionic liquids. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 84(2): 202-207.

Leon R., Fernandes P., Pinheiro H. M. and Cabral J. M. S. 1998. Whole-cell biocatalysis in organic media. Enzyme and Microbial Technology. 23(7): 483-500.

Li X., Yang J., Li X., Gu W., Huang J. and Zhang K. Q. 2008. The metabolism of ferulic acid via 4-vinylguaiacol to vanillin by *Enterobacter sp.* Px6-4 isolated from Vanilla root. Process Biochemistry. 43(10): 1132-1137.

Licandro-Seraut H., Roussel C., Perpetuini G., Gervais P. and Cavin J. F. 2013. Sensitivity to vinyl phenol derivatives produced by phenolic acid decarboxylase activity in *Escherichia coli* and several food-borne Gram-negative species. Applied Microbiology and Biotechnology. 97(17): 7853-7864.

Logt E. M. J., Roelofs H. M. J., Nagengast F. M. and Peters W. H. M. 2003. Induction of rat hepatic and intestinal UDP-glucuronosyltransferases by naturally occurring dietary anticarcinogens. Carcinogenesis. 24(10): 1651-1656.

López-García G. 2015. Caracterización, identificación y cuantificación de compuestos fenólicos resultantes del proceso de nixtamalización. Maestría en Ciencias. Tesis de Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.

López-Martínez L. X., Oliart-Ros R. M., Valerio-Alfaro G., Lee C. H., Parkin K. L. and Garcia H. S. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT-Food Science and Technology*. 42(6): 1187-1192.

Lu J. and Li Y. 2006. Effects of arabinoxylan solubilization on wort viscosity and filtration when mashing with grist containing wheat and wheat malt. *Food Chemistry*. 98(1): 164-170.

Ma X. K. and Dauquilis A. J. 2014. Transformation of ferulic acid to vanillin using a fed-batch solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. *Biotechnology Progress*. 30(1): 207-214.

Mathew S. and Abraham T. E. 2006. Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Critical Reviews in Microbiology*. 32(3): 115-125.

Mathew S., Abraham T. E. and Sudheesh S. 2007. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 44(2): 48-52.

Matsuura T. and Sourirajan S. 1971. Physicochemical criteria for reverse osmosis separation of alcohols, phenols, and monocarboxylic acid in aqueous solutions using porous cellulose acetate membranes. *Journal of Applied Polymer Science*. 15(12): 2905-2927.

Max B., Carballo J., Cortés S. and Domínguez J. M. 2012. Decarboxylation of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166(2): 289-299.

Menéndez J. A., Vázquez-Martin A., Oliveras-Ferraro C., García-Villalba R., Carrasco-Pancorbo A., Fernández-Gutiérrez A. and Segura-Carretero A. 2008. Analyzing effects of extra-virgin olive oil polyphenols on breast cancer-associated fatty acid synthase protein expression using reverse-phase protein microarrays. *International Journal of Molecular Medicine*. 22(4): 433.

Meraz K. A. S., Vargas S. M. P., Maldonado J. T. L., Bravo J. M. C., Guzman M. T. O. and Maldonado E. A. L. 2016. Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chemical Engineering Journal*. 284: 536-542.

Miller G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*. 31(3): 426-428.

Mishra S., Sachan A., Vidyarathi A. S. and Sachan S. G. 2014. Microbial production of 4-vinylguaiacol from ferulic acid by *Bacillus cereus* SAS-3006. *Biocatalysis and Biotransformation*. 32(5-6): 259-266.

Mishra S., Sachan A., Vidyarathi A. S. and Sachan S. G. 2014. Transformation of ferulic acid to 4-vinylguaiacol as a major metabolite: a microbial approach. *Reviews in Environmental Science and BioTechnology*. 13(4): 377-385.

Murray J. C., Burch J. A., Streilein R. D., Lannacchione M. A., Hall R. P. and Pinnell S. R. 2008. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 59(3): 418-425.

Niño-Medina G., Carvajal-Millán E., Rascon-Chu A., Márquez-Escalante J. A., Guerrero V. and Salas-Muñoz E. 2010. Feruloylated arabinoxylans and arabinoxylan gels: structure, sources and applications. *Phytochemistry Reviews*. 9(1): 111-120.

Nomura E., Hosoda A., Mori, H. and Taniguchi H. 2005. Rapid base-catalyzed decarboxylation and amide-forming reaction of substituted cinnamic acids via microwave heating. *Green Chemistry*. 7(12): 863-866.

Ochoa M. L. A., Figueroa C. J. D., Delgado L. E., Gallegos I. J. A. and Morales C. J. 2009. Efecto de la concentración de hidróxido de calcio y tiempo de cocción del grano de maíz (*Zea mays* L.) nixtamalizado, sobre las características fisicoquímicas y reológicas del nixtamal. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 59(4): 425.

Ou S. and Kwok K. C. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84(11): 1261-1269.

Paredes-López O., Guevara-Lara F. and Bello-Pérez L. A. 2009. La nixtamalización y el valor nutritivo del maíz. *Ciencias*. 92(92): 62-70.

Park J. B., Bühler B., Habicher T., Hauer B., Panke S., Witholt B. and Schmid A. 2006. The efficiency of recombinant *Escherichia coli* as biocatalyst for stereospecific epoxidation. *Biotechnology and Bioengineering*. 95(3): 501-512.

Paz A., Carballo J., Pérez M. J. and Domínguez J. M. 2016. *Bacillus aryabhatai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(10): 159.

Paz-Samaniego R., Carvajal-Millan E., Sotelo-Cruz N., Brown F., Rascón-Chu A., López-Franco Y. L. and Lizardi-Mendoza J. 2016. Maize Processing Waste Water Upcycling in Mexico: Recovery of Arabinoxylans for Probiotic Encapsulation Sustainability. 8(11): 1104-1116.

Peng X., Misawa N. and Harayama S. 2003. Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3); 1417-1427.

Pflugfelder R. L., Rooney L. W. and Waniska, R. D. 1988. Dry matter losses in commercial corn masa production. *Cereal Chem*. 65(2): 127-132.

Prim N., Pastor F. I. J. and Diaz P. 2003. Biochemical studies on cloned *Bacillus* sp. BP-7 phenolic acid decarboxylase PadA. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63(1): 51-56.

Ramírez-Romero G., Reyes-Velazquez M. and Cruz-Guerrero A. 2013. Estudio del nejayote como medio de crecimiento de probióticos y producción de bacteriocinas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 12(3): 463-471.

Reis R. and Zydney A. 2007. Bioprocess membrane technology. *Journal of Membrane Science*. 297(1): 16-50.

Reyes-Vidal M. Y., Diez Á. A., Martínez-Silva A. and Asaff A. 2012. Investigación, desarrollo tecnológico e innovación para el cuidado y reuso del agua. *Estudios Sociales*. 2: 203-216.

Rivas B., Rodríguez H., Curiel J. A., Landete J. M. and Muñoz R. 2008. Molecular screening of wine lactic acid bacteria degrading hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(2): 490-494.

Rodríguez H., Landete J. M., Curiel J. A., de Las Rivas B., Mancheño J. M. and Muñoz R. (2008). Characterization of the p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(9): 3068-3072.

Rojas-Molina I., Gutiérrez-Cortez E., Palacios-Fonseca A., Baños L., Pons-Hernández J. L., Guzmán-Maldonado S. H. and Rodríguez M. E. 2007. Study of

structural and thermal changes in endosperm of quality protein maize during traditional nixtamalization process. *Cereal Chemistry*. 84(4): 304-312.

Rosazza J. P. N., Huang Z., Dostal L., Volm T. and Rousseau B. 1995. Review: biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product. *Journal of Industrial Microbiology*. 15(6): 457-471.

Rosentrater K. A. 2006. A review of corn masa processing residues: Generation, properties, and potential utilization. *Waste Management*. 26(3): 284-292.

Rosentrater K. A., Flores R. A., Richard T. L. and Bern C. J. 1999. Physical and nutritional properties of corn masa by-product streams. *Applied Engineering in Agriculture*. 15(5): 515-523.

Ruiz-Gutiérrez M. G., Quintero-Ramos A., Meléndez-Pizarro C. O., Lardizábal-Gutiérrez D., Barnard J., Márquez-Melendez R. and Talamás-Abbud R. 2010. Changes in mass transfer, thermal and physicochemical properties during nixtamalization of corn with and without agitation at different temperatures. *Journal of Food Engineering*. 98(1): 76-83.

Saija A., Tomaino A., Trombetta D., De Pasquale A., Uccella N., Barbuzzi T. and Bonina F. 2000. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International Journal of Pharmaceutics*. 199(1): 39-47.

Salgado J. M., Max B., Rodríguez-Solana R. and Domínguez J. M. 2012. Purification of ferulic acid solubilized from agroindustrial wastes and further conversion into 4-vinyl guaiacol by *Streptomyces setonii* using solid state fermentation. *Industrial Crops and Products*. 39: 52-61.

Salomone J. and Xia E. 2006. Ophthalmic solution with a flavoring agent. *Patente Americana*. No. US 2006/0292188 A1

Schmid A., Dordick J. S., Hauer B., Kiener A., Wubbolts M. and Witholt B. 2001. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*. 409(6817): 258-268.

Schrewe M., Julsing M. K., Bühler B. and Schmid A. 2013. Whole-cell biocatalysis for selective and productive C–O functional group introduction and modification. *Chemical Society Reviews*. 42(15): 6346-6377.

Sefa-Dedeh S., Cornelius B., Sakyi-Dawson E. and Afoakwa E. O. 2004. Effect of nixtamalization on the chemical and functional properties of maize. *Food Chemistry*. 86(3): 317-324.

Serdakowski A. L. and Dordick J. S. 2008. Enzyme activation for organic solvents made easy. *Trends in Biotechnology*. 26(1): 48-54.

Serna-Saldivar S. O., Gomez M. H. and Rooney L. W. 1990. Technology, chemistry, and nutritional value of alkaline-cooked corn products. *Advances in Cereal Science and Technology*.

Seshime Y., Juwadi P. R., Fujii I. and Kitamoto K. 2005. Genomic evidences for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 337(3):747-751.

Sgarbossa A., Giacomazza D. and Di Carlo M. 2015. Ferulic acid: A hope for Alzheimer's disease therapy from plants. *Nutrients*. 7(7): 5764-5782.

Sikkema J., De Bont J. A. and Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. 59(2): 201-222.

Simpson C. J., Fitzhenry M. J. and Stamford N. P. J. 2005. Preparation of vinylphenols from 2-and 4-hydroxybenzaldehydes. *Tetrahedron Letters*. 46(40): 6893-6896.

Singleton V. L. and Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16(3): 144-158.

Sinha A. K., Sharma A. and Joshi B. P. 2007. One-pot two-step synthesis of 4-vinylphenols from 4-hydroxy substituted benzaldehydes under microwave irradiation: a new perspective on the classical Knoevenagel–Doebner reaction. *Tetrahedron*. 63(4): 960-965.

Stead D. 1993. The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 75(2): 135-141.

US Code of Federal Regulations; Food and Drug Administration: Washington, DC, USA, 1985; Volume 21, 101.22a.3.

Valderrama-Bravo C., Gutiérrez-Cortez E., Contreras-Padilla M., Rojas-Molina I., Mosquera J. C., Rojas-Molina A. and Rodríguez-García M. E. 2012. Constant pressure filtration of lime water (nejayote) used to cook kernels in maize processing. *Journal of Food Engineering*. 110(3): 478-486.

Van der Bruggen B. 2009. Chemical modification of polyethersulfone nanofiltration membranes: a review. *Journal of Applied Polymer Science*. 114(1): 630-642.

Viniegra-González G. and Ramírez-Romero G. 2007. Proceso de utilización del nejayote. *Solicitud Patente Mexicana MX/A/2007/010310*.

Vvrides I., Aqathangelou M., Dimitriou R., Souroullas K., Salamex A., Ioannou A. and Koutinas M. 2015. Novel *Halomonas* sp. B15 isolated from Larnaca Salt Lake in Cyprus that generates vanillin and vanillic acid from ferulic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(8): 1291-1296.

Wayman M. and Tseng M. C. 1976. Inhibition-threshold substrate concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 18(3): 383-387.

Winkler J. and Kao K. C. 2011. Transcriptional analysis of *Lactobacillus brevis* to N-butanol and ferulic acid stress responses. *PloS one*. 6(8): e21438.

Wohlgemuth R. 2010. Biocatalysis—key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*. 21(6): 713-724.

Xu P., Bellona C. and Drewes J. E. 2010. Fouling of nanofiltration and reverse osmosis membranes during municipal wastewater reclamation: membrane autopsy results from pilot-scale investigations. *Journal of Membrane Science*. 353(1): 111-121.

Yilmaz E. E., Özvural E. B. and Vural H. 2011. Extraction and identification of proanthocyanidins from grape seed (*Vitis vinifera*) using supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 55(3): 924-928.

Zamzuri N. A. and Abd-Aziz S. 2013. Biovanillin from agro wastes as an alternative food flavour. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(3): 429-438.

Zhang Y., Song L., Gao Q., Yu S. M., Li L. and Gao N. F. 2012. The two-step biotransformation of monosodium glutamate to GABA by *Lactobacillus brevis* growing and resting cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94(6):1619-1627.