

Actualidades de la producción de feruloil esterasa por fermentación en estado sólido

Present Times of the Production of Feruloil Esterasa for Solid State Fermentation

MSc. Giselle Morell-Nápoles, giselle.morell@reduc.edu.cu, Dr.C. María Caridad Julián-Ricardo, maria.julian@reduc.edu.cu, Dr.C. Luis B. Ramos-Sánchez, luis.ramos@reduc.edu.cu

Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad de Camagüey, Cuba

Las enzimas celulolíticas han tomado en la actualidad una importancia significativa en la producción de nuevos productos en la industria de biopolímeros, biocombustibles, alimenticia y farmacéutica. El principal inconveniente para la utilización de la biomasa celulósica lo constituye la compleja estructura cristalina, resistente a la hidrólisis que forman sus compuestos principales: celulosa, hemicelulosa y lignina, además de la ausencia de una tecnología de bajo costo que compita con las actuales enzimas comerciales disponibles en el mercado. Recientemente, se ha descubierto que la enzima feruloil esterasa perteneciente al grupo de las hidrolasas, constituye la clave para lograr romper esa barrera y acceder a los recursos disponibles de las paredes celulares de las plantas, actuando de forma sinérgica con otras en un complejo enzimático altamente eficiente. La obtención de esta enzima a partir de microorganismos ha sido estudiada por numerosos autores a escala de banco y piloto, presentando deficiencias que aun no han sido totalmente resueltas y que impiden el diseño de una tecnología eficiente para la producción de esta enzima. El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica con vistas a la identificación de cuáles son las limitaciones de la producción de feruloil esterasa por FES y proponer una alternativa que permita el alcance de resultados positivos.

Palabras clave: biomasa, feruloil esterasa, ácido felúrico, fermentación en estado sólido.

The production of cellulolytic enzymes has taken a significant importance at the present time in the production of new products in the biopolymers industry, biofuels, nutritious and pharmacist. The main inconvenience for the use of the cellulosic biomass constitutes it the complex crystalline structure, resistant to the hydrolysis that form its main compounds, cellulose, besides the absence of a technology of low cost that competes with the current available commercial enzymes in the market. Recently, has been discovered that the enzyme feruloil esterasa belonging to the group of the hydrolases, constitutes the key to be able to break that barrier and to consent to the available resources of the cellular walls of the plants, acting in way xinergetic with others in a the highly efficient enzymatic complex. The obtaining of this enzyme starting from microorganisms for fermentation has been studied by numerous authors to scale that of bank and pilot presenting deficiencias that have not still been completely resolved and that they impede the design of an efficient technology for the production of this enzyme. In this work is carried out a revision with a view to identifying which the weaknesses and limitations of the fermentation process is a breach that allows tracing a strategy with positive results opening up.

Keywords: biomas, feruloil esterase, acid ferulic, solid state fermentation.

Introducción

La biomasa renovable producida por la fotosíntesis de las plantas es el recurso lignocelulósico más abundante en la tierra. Está compuesto de tres biopolímeros principales que forman la pared celular vegetal: celulosa, hemicelulosa y lignina [1, 2], además de pequeñas cantidades del polisacárido pectina, cenizas y

proteínas. Una potencial aplicación de las grandes cantidades de lignocelulosa es en la obtención de biopolímeros, derivados químicos y biocombustibles [3-7], como una fuente energética alternativa a los combustibles fósiles que actualmente se utilizan, y con vistas al aprovechamiento de residuos agroindustriales. El principal inconveniente para la utilización de la biomasa celulósica lo constituye la compleja estructura supramolecular cristalina y

organizada, resistente a la hidrólisis que forman sus compuestos principales [8-11] y la ausencia de una tecnología de bajo costo que compita con las actuales enzimas comerciales disponibles en el mercado. Además, estos procesos requieren tratamientos previos a la biomasa tanto químicos como físicos que consumen gran cantidad de energía [6] por lo que una estrategia prometedora consiste en el uso de enzimas de organismos ligninolíticos que remodelen y degraden eficientemente la pared celular, eviten el craqueo de la lignina, la generación de productos tóxicos en los licores de la sacarificación e impacten en la menor medida posible el medio ambiente /6, 9/.

En la naturaleza hay organismos que pueden degradar los componentes de la lignocelulosa /12/. Se han identificado hongos y bacterias con propiedades lignocelulolíticas, que producen complejos multienzimáticos de celulasas y hemicelulasas /13-21/. Estos biodegradan los complejos para formar azúcares monoméricos para lo que requieren de la acción cooperada de varias enzimas hidrolíticas dentro de las que están: las celulasas, las xilanasas y otras accesorias como la feruloil esterasa (FAE) /22/, esta enzima hidroliza los enlaces éster que unen al ácido ferúlico, con los azúcares ramificados liberando la lignina y los xilanos /15, 16/.

Recientes estudios han demostrado que esta enzima constituye la llave para lograr la completa hidrólisis de la hemicelulosa y liberar los ácidos hidroxicinámicos correspondientes /23/, además puede catalizar la esterificación del glicerol el cual constituye el derivado mayor de la industria del biodiesel /24/.

El ácido ferúlico producido durante la acción de la FAE tiene numerosas aplicaciones en la industria farmacéutica y cosmética como absorbente de luz ultravioleta en los componentes de los bloqueadores solares, antioxidantes para la lucha contra el cáncer y enfermedades cardiovasculares, estimula el sistema inmune, protege al cerebro contra la enfermedad del Alzheimer, disminuye la producción de colesterol, además se utiliza en la industria alimenticia en la protección de alimentos y como precursor de aromas /22, 25-27/.

La fermentación en estado sólido (FES) es un proceso muy utilizado en la producción de enzimas como las celulasas, xilanasas, glycosidasas, lignanas, proteasas, lipasas, pectinasa, galactosidasas, glutaminasas, amilasas, innulinasas, fitasas y esterasas /28, 29/, pero presenta una serie de inconvenientes que se resumen en el pretratamiento a la biomasa, el compromiso entre el tamaño de partícula y la aireación del cultivo, la dificultad en el control de la humedad relativa y la temperatura, el tipo y tamaño del inóculo, la remoción del calor metabólico generado en el proceso, la velocidad de consumo de oxígeno, la generación de dióxido de carbono, el modelo de contacto y el tiempo de fermentación. Todos estos aspectos han sido estudiados por numerosos autores para estas enzimas comerciales a escala de laboratorio /6, 23, 30-38/.

A pesar de la importancia que tiene el empleo de la enzima FAE en el proceso de hidrólisis completa de materiales lignocelulósicos estas deficiencias no se encuentran bien definidas [27], por lo que se planteó como objetivo de este trabajo realizar una revisión bibliográfica con vistas a la identificación de cuáles son las limitaciones de la producción de feruloil esterasa por FES y proponer una alternativa que permita el alcance de resultados positivos.

Desarrollo

Microorganismos productores de la enzima FAE

Existen muchos reportes en la bibliografía de microorganismos productores de la enzima FAE /39/, pero son escasos para el caso de especies de bacterias y levaduras, siendo el reino de los hongos filamentosos el más descrito.

Soccol, *et al.* /5/ resumieron que los hongos pueden degradar celulosa, hemicelulosa y lignina en las plantas debido a un complejo enzimático que producen, que incluyen celulasas, hemicelulasas y ligninasas. Señalaron que los géneros más reportados en la última década incluyen cepas de *Trichoderma*, *Penicillium* y *Aspergillus*.

Bonnin, *et al.* /40/ reportaron la expresión de enzimas en *Aspergillus niger* entre las cuales identificaron un grupo de FAEs, estas enzimas fueron probadas para liberar el ácido ferúlico de la pulpa de la remolacha y el salvado de maíz, tratado previamente con vapor. Los resultados de liberación de ácido ferúlico se compararon con las actividades enzimáticas medidas en mezclas disponibles comercialmente. Se comprobó que las enzimas de *Aspergillus niger* eran más variadas y tenían una actividad tan eficaz como la que tiene la mezcla comercial. Este estudio muestra un interés industrial en esta especie de hongos para la producción de la enzima FAE.

Gottschalk, *et al.* /30/, estudiaron la producción de enzimas glucosidasa, xilanasas y FAE, obtenidas de los hongos filamentosos *Trichoderma reesei* y *Aspergillus awamori* en la hidrólisis enzimática del bagazo de caña pretatado con vapor, *Aspergillus awamori* resultó ser la cepa más productora de FAE con una actividad de 3,8 U/g de biomasa.

Topakas, *et al.* /41/ analizaron 48 reportes bibliográficos de los principales microorganismos productores de la enzima FAE, de ellos 16 corresponden al género *Aspergillus*, aunque existen también reportes de levaduras y bacterias, esto señala la tendencia al aislamiento de microorganismos fúngicos a partir de fuentes de carbono lignocelulósicas.

Pérez-Morales /21/ realizaron trece aislamientos con el objetivo de seleccionar cepas de hongos filamentosos capaces de producir enzimas tipo FAE y pectinadas utilizando medios selectivos y metodologías por halos de hidrólisis. Los análisis morfológicos confirmaron que la mayor cepa productora resultó ser del género *Aspergillus* evidenciando el potencial que tiene este microorganismo en la producción de la enzima.

Hinz *et al.* /42/ realizaron estudios con hongos filamentosos de amplio uso en la industria del biofuel como *Aspergillus sp.* y *Trichoderma reesei*, concluyeron que ambas especies resultan una alternativa atractiva para la producción de un número grande de hemicelulasas, entre las cuales se destaca la feruloil.

Mandalari *et al.* /43/ descubrieron la actividad de una FAE y de una xilanasas en el supernadante de una fermentación de *Humicola grisea*, *thermoidea* y *Talaromyces stipitatus* crecidos en un medio que contenía como fuente de carbono salvado de cebada y salvado de trigo, dos derivados agroindustriales. Las actividades máximas se reportaron en el cultivo de *H. grisea* con 16,9 U/ml y 9,1 U/ml respectivamente, lo cual demuestra la capacidad de síntesis de este tipo de enzimas por estos microorganismos.

Szwajgier, *et al.* /44/ estudiaron una FAE producida por *Lactobacillus acidophilus* que fue utilizada con éxito, la enzima se produjo en biorreactores, se purificó y se hizo un preparado monoenzimático capaz de liberar ácido ferúlico y ácido vanilínico utilizando como sustrato salvado de cebada cervecera.

Influencia de los pretratamientos a la biomasa en la actividad enzimática de la FAE

El papel principal de un pretratamiento es disminuir la interacción entre los componentes principales de la pared celular, que los haga susceptibles a la acción de los microorganismos. Las mejores condiciones de un pretratamiento deben definirse en base a la mayor recuperación de azúcares solubles y evitar la formación de compuestos inhibitorios a la hidrólisis subsecuente y procesos de fermentación. Muchos métodos se han usado para los pretratamientos de materiales lignocelulósicos. Balat /35/, realizó una comparación bien detallada de los métodos de pretratamiento de la biomasa que incluye: el molinado mecánico de la biomasa, la explosión de vapor, la explosión de CO₂, la ozeonolisis, la hidrólisis alcalina, los solventes orgánicos, la pirolisis, pulsaciones de un campo eléctrico y el biológico. Señaló las ventajas y las desventajas de cada uno de ellos en cuanto a costo y rendimiento y concluyó que el tratamiento con explosión de vapor es el más utilizado aunque esto no quiere decir que es el que mejor resultados muestra.

Xiros, *et al.* /45/ realizaron un pretratamiento a la biomasa inicial (salvado de cebada cervecera) con dos tipos de proteasas (alcalasa y papaína), luego realizó la hidrólisis enzimática con un preparado enzimático de *Fosariumoxy sporum*

compuesto por xilanasas y FAEs obteniendo un 100 % de rendimiento expresado en la cantidad de ácido ferúlico liberado, en comparación con el material sin pretratar. Este estudio revela el importante papel que juegan las proteasas para una degradación eficaz de los arabinoxilanos del BSG y para la liberación del ácido ferúlico mejorado por las enzimas hemicelulolíticas de *F. oxysporum*.

Balat /35/ probó varios pretratamientos antes de la sacarificación del grano de cebada e hidrolizados de paja para la producción de bioetanol por vía enzimática. El microorganismo utilizado fue una bacteria recombinante. Los pretratamientos estudiados consistieron en la hidratación de la biomasa con agua caliente seguida de una explosión de vapor, diluciones con ácidos, álcalis y peróxidos alcalinos en una proporción de 10 % de carga de sólidos, 0,75 % (w/v) del ácido, y una temperatura moderada de 121 °C. Los resultados demostraron un 88 a 91 % de rendimiento de los azúcares, y el tratamiento enzimático posterior, 0,48 g ethanol/g de los azúcares disponibles. Los resultados descritos son de gran importancia para las tecnologías de bioprocesos en vías de desarrollo de conversión de lignocelulósicos en etanol y otros productos de la fermentación.

Girio, *et al.* /34/ refirieron que el mejor tratamiento para la producción de etanol por FES de lignocelulósicos por vía enzimática es la explosión de vapor, aunque señalaron que queda un camino abierto al estudio del uso de líquidos iónicos en los pretratamientos y que se requiere de una búsqueda de nuevos microorganismos en la inmensa biodiversidad que aprovechen más extensamente las condiciones de temperatura, pH del medio, sean resistentes a la toxicidad y adaptables a cualquier sustrato.

Por su parte Talebnia, *et al.* /36/ plantearon que los pretratamientos a la biomasa juegan un papel importante en la hidrólisis de materiales lignocelulósicos, y que ningún método conocido por sí solo ha sido capaz de reunir todos los requisitos que se requieren, sin embargo, concluyeron que una alternativa prometedora sería tratar de combinar y adaptar algunos de ellos a las condiciones correspondientes teniendo en cuenta

todos los factores incluso el equilibrio de energía, carga del sólido y uso mínimo de químicos.

Actividad enzimática de la FAE

La enzima FAE fue aislada por primera vez por Faulds y Williamson /27/ en el año 1991, se clasificó en base a su especificidad en la síntesis de metil ésteres de ácidos hidroxixinámicos en cuatro grupos: A, B, C y D, por lo que su actividad varía en función del sustrato inductor. La elección del sustrato es de gran importancia para la producción de FAE, ya que no solo sirve como fuente de carbono y energía, sino también se ha visto que proveen los compuestos de inducción necesarios para los microorganismos. Se han utilizado fuentes de carbono complejas como el salvado de maíz, salvado de trigo, pulpa de remolacha azucarera, etc., que contienen altas concentraciones de ácido ferúlico y han sido eficientes para la producción de FAE. Sin embargo, hasta ahora los estudios de inducción han sido escasos y no hay evidencia clara de que exista una correlación directa entre las especies de microorganismos y los patrones de inducción de la FAE /41/.

Mathew, *et al.* /46/ estudiaron varias cepas del hongo filamentoso *Aspergillus* productoras de la enzima FAE y su relación con varios sustratos: bagazo de caña, salvado de arroz, maíz y trigo, comprobaron que el comportamiento de la actividad enzimática de la misma cepa ante diferentes sustratos no es la misma y que estas se ven inducidas por los componentes de la pared celular de la planta. El ácido ferúlico constituye, aproximadamente, el 0,5 % en el salvado del trigo, 0,9 % en el arroz y 3,1 % en el maíz, siendo este último el que mejores resultados de expresión enzimática arrojó.

Por otra parte, Faulds, *et al.* /47/ evaluaron el efecto de diferentes fuentes de carbono tipo cereal (xilano de avena, xilano de avena-ácido ferúlico, trigo sin salvado y salvado de trigo) y tipo pulpa (pulpa de remolacha azucarera, pulpa de café) sobre la producción de feruol, cafeoil y p-cumarolesterasas por *Aspergillus awamori*. En el caso de la producción de FAE la mejor fuente de inductores fue la combinación xilano de avena (1,5 % p/v) y ácido ferúlico (0,03 % p/v).

Fauld, *et al.* /48/ y Mancera, *et al.* /49/ estudiaron la influencia de ácidos fenólicos (caféico y p-cumárico) libres en la fibra lignocelulolítica y encontraron que pueden producir inhibición a la actividad enzimática de la FAE, por lo que sugirieron que sean eliminados antes de realizar la fermentación.

García, *et al.* /50/ estudiaron la relación entre una xilanasas y una enzima del tipo FAE provenientes de *Streptomyces avermitilis* y comprobaron que la actividad en la degradación de muestras de materiales lignocelulósicos que contenían xilano de avena y salvado de trigo, aumentaron considerablemente con la adición de altas concentraciones de xilanasas y FAEs juntas en presencia de glicerol y manitol. Este estudio demuestra que la actividad de la enzima FAE pudiera elevarse en presencia de grandes cantidades de xilanasas.

Yu /51/ y Topakas, *et al.* /52/ estudiaron la interacción de una xilanasas de *Trichoderma*, una FAE de *Aspergillus* y una celulasa comercial. El preparado redujo la concentración de azúcares a un 69 %, valor mucho mayor que el obtenido cuando se usan preparados monoenzimáticos de xilanasas y celulasas que revelaron solo un 33 % y un 39 % de liberación de azúcares, respectivamente. Estos resultados indican que la interacción sinérgica de las enzimas logra aumentar significativamente la hidrólisis enzimática a partir de cáscara de avena como fuente de carbono.

Xiros, *et al.* /45/ realizaron reacciones de hidrólisis de salvado de trigo con varios preparados enzimáticos que contenían FAE y xilanasas. Comprobaron que a varias concentraciones la FAE y la xilanasas por sí solas no eran capaces de liberar ácido ferúlico, la concentración de ácido ferúlico más alta (32 mg L⁻¹) se logró en la presencia de la mezcla de enzimas después de las 48 h de incubación.

Existen reportes bibliográficos que demuestran que algunos factores pudieran disminuir o aumentar la actividad enzimática de la FAE. Faulds, *et al.* [47] demostraron que la enzima FAE tipo C, muestra una alta especificidad para el ferulato

soluble y los arabinoxilanos, además estas enzimas han reforzado su actividad con once familias de xilanasas que muestran actividad preferencial por diferulatos. Este resultado pudiera estar relacionado con los tipos de enlaces éster con los arabinoxilanos, y constituye un aporte en el mejoramiento de la industria panadera.

Selig, (2008), estudió la hidrólisis de 20 g de bagazo de caña pretratado con vapor con mezclas de enzimas producidas por los hongos *Trichoderma reesei* y *Aspergillus awamori* con resultados positivos, la degradación enzimática constituyó el 81 % de hidrólisis de la celulosa y el 91 % de hidrólisis del xilano con las mezclas enzimáticas.

Mukherjee /22/ estableció que no existe relación entre la actividad enzimática de la FAE y el ácido ferúlico esterificado y concluyó que los niveles de ácido ferúlico libre son los que inducen la actividad de la enzima bajo determinadas condiciones y no el ácido ferúlico esterificado.

El uso de los co-solventes orgánicos en la degradación del material lignocelulósico insoluble en agua como la lignina, facilita la actividad enzimática en el sustrato. Faulds, *et al.* /47/ evaluaron el uso del más adecuado co-solvente orgánico para la enzima FAE expresada en *Aspergillus niger* y *Talaromices epitatus*, demostrando que concentraciones menores que el 15 % de dimetilsulfoxido (DMSO) aumenta la hidrólisis enzimática, mientras que concentraciones mayores que el 20 %, reduce la actividad. Demostró que generalmente los alcoholes (metanol, etanol y propanol) reducen la eficiencia hidrolítica de las FAEs lo que tiene implicaciones directas en la inhibición y bajos rendimientos en la sacarificación y fermentación simultáneas para la producción de bioalcoholes.

La FAE y su relación en la esterificación y transesterificación de ácidos hidroxicinámicos y el glicerol

Recientes estudios han demostrado que la enzima FAE participa en reacciones de esterificación y transesterificación de ácidos hidroxicinámicos y el glicerol lo que abre un nuevo campo a la investigación en aras de obtener nuevos productos de alto valor agregado.

Tsuchiyama, *et al.* /27/ estudiaron la síntesis de varios esteres del ácido ferúlico a partir de la reacción de esterificación y transesterificación de ácidos hidroxicinámicos e hidrogenoicos y varios azúcares tales como: arabinosa, fructuosa, galactosa, glucosa, ramanosa, xilosa, maltosa, sucrosa y tetralosa con glicerol. Utilizó preparados de celulasas y peptinasa que tienen como contaminante algunas FAEs ya que la enzima FAE no se encuentra disponible en el mercado. Los rendimientos de los esteres del ácido ferúlico en el caso de los azúcares resultaron ser más bajos en comparación con el glicerol. Este estudio contribuye a la búsqueda de compuestos de derivados del ácido ferúlico como el glicerilferulato, más solubles en agua y que pudieran emplearse con mayor eficacia en la industria cosmética, alimenticia y farmacéutica.

Vafiadi, *et al.* /24/ estudiaron la esterificación enzimática del glicerol, el mayor subproducto de la industria del biodiesel, con ácido sinápico, catalizada por una enzima del tipo FAE. Constituye el primer reporte de este tipo de actividad enzimática en líquidos iónicos y la base para la explotación extensa de FAEs en la modificación de compuestos insolubles, producción de antioxidantes y reacciones convencionales.

Aumento de la expresión de la FAE a partir de la recombinación genética en microorganismos y su inmovilización en soportes enzimáticos

La enzima FAE se produce en niveles muy bajos en organismos nativos lo que hace prohibitivamente caro su producción industrial. Numerosos autores plantean que pueden lograrse niveles altos de expresión de las enzimas requeridas en la recombinación de los sistemas de expresión microbianos conocidos como *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*.

La expresión heteróloga en otros organismos celulares ha sido empleada con éxito en el caso de una xilanasa, *Thermomyces lanuginosus* expresado en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* /5/. Esta levadura presenta varias ventajas encima de otros microorganismos ya que se han conformado sistemas para la hyper-expresión de

enzimas y trabajos para desarrollar los vectores mejorados además se plantea que una fuente prometedora pudiera estar en el descubrimiento de nuevas enzimas como la FAE y clonarlas en el genoma de microorganismos cultivables.

Huang, *et al.* /53/ realizaron la clonación de un gen de *Thermobifida fusca* en la levadura *Yarrowia lipolytica* y logró expresar la enzima FAE en el orden de los 70,94 U/ml valor aproximadamente 140 veces mayor que lo observado en la expresión del sistema de *Pichia pastoris*. Este estudio demostró la eficacia de la manipulación genética en microorganismos que no producen nativamente la enzima dándose respuesta a la problemática de la baja expresión de la enzima en los organismos nativos.

Otro aspecto de gran interés en elevar la actividad enzimática recae en los estudios de inmovilización enzimática para la enzima FAE. Los reportes bibliográficos en este sentido son muy escasos, entre los más importantes se encuentra el realizado por Thörn, *et al.* /54/ en el cual inmovilizaron una enzima comercial del tipo FAE (Depol 740L) utilizada para el refinamiento de ácidos hidroxicinámicos, un grupo de compuestos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas donde la modificación de sus propiedades de solubilidad son necesarias por su uso ser de gran interés en diversos productos comerciales; en un material mesoporoso de sílice. En el estudio se demostró que los mayores resultados de actividad se efectuaron en tamaños de poros de 9 nm comparados con tamaños de 5 nm. La inmovilización de la enzima en sílice mesoporosa mostró una estabilidad operacional excelente y cambió la especificidad de las enzimas para favorecer la transesterificación y liberación del butilferulato de un 70 % a un 90 % comparada con las enzimas libres.

Tipo de fermentación utilizada para la producción de la FAE

Aunque no existe una tecnología de fermentación establecida para la producción a escala industrial de la enzima FAE muchos han sido los estudios que en este sentido buscan mejorar las condiciones de fermentación y lograr

altos valores de expresión y actividad. Los procesos fermentativos varían desde la fermentación sumergida hasta la FES, siempre hasta escala de banco. Asther, *et al.*/55/compararon la actividad de una enzima FAE por fermentación sumergida y FES, resumieron que en estado sólido la actividad de la enzima aumentó cincuenta veces por encima de lo obtenido por fermentación sumergida, utilizando como microorganismos al hongo filamentosos *Aspergillus niger* y derivados agrícolas como sustrato. Este trabajo confirma las potencialidades de la FES por encima de la fermentación sumergida.

Topakas, *et al.*/56/ resumieron las ventajas de la producción de la enzima FAE por FES, discutieron las ventajas, sobre todo para los cultivos fúngicos, los microorganismos crecen en los materiales sólidos sin la presencia de líquido libre. El agua está presente absorbida en un complejo que forma la matriz sólida del sustrato, la productividad por volumen del reactor es más alta en comparación con el cultivo sumergido, asimismo los costes operacionales también son más bajos porque la maquinaria y la planta que se requieren son más simples. Además, se pueden aprovechar sustratos complejos y residuos provenientes de la industria agrícola y la silvicultura que proporcionen la fuente de carbono induciendo la producción de FAEs. Resumieron, además, varios datos de procesos llevados a cabo en FES utilizando como microorganismos *Aspergillus niger*, *Penicillium*, *Sporotrichum thermophilic* para la obtención de la enzima a escala de banco.

Zeng, *et al.* /33/ demostraron una variante de FES a partir de estudios realizados por Chen /57/ y Xu /58/ que consistían en la variación de la presión en el reactor, (la presión alta 0,2 MPa por 20 s y la duración de presión baja 30 min), este método mejoró la producción de FAE por *A. niger* comparado con una fermentación sólida tradicional. El rendimiento de la enzima producida fue de 881 mU/g a las 48 h bajo la condición perfeccionada influenciada por la temperatura, O₂, y concentración de CO₂, además de las variaciones de intensidad de respiración en el proceso de fermentación, el método para FES mejora la transferencia de masa y calor. Esta

variante podría considerarse en siguientes proyectos de diseño de FES.

Conclusiones

Los hongos filamentosos son los microorganismos mayores productores de la enzima FAE, se destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Es importante seleccionar el mejor sustrato inductor para la producción enzimática, así como potenciar la sinergia que existe entre la enzima FAE y las xilanasas que pudieran ser empleadas en la mejora de los procesos de degradación enzimática de materiales lignocelulósicos. Algunos compuestos presentes en el sustrato pudieran mejorar la actividad enzimática como los co-solventes orgánicos y el ácido ferúlico. Se evidencia la utilidad que tiene el tratamiento previo de la biomasa. Por otro lado, se referencian los primeros pasos en la clonación de genes que codifiquen para la producción de enzimas del tipo feruloil en microorganismos no productores con vista a elevar su productividad y la potencialidad que muestra la inmovilización de enzimas en soportes. Es importante la participación de esta enzima en las reacciones de esterificación y transesterificación de ácidos hidroxicinámicos y glicerol en la producción de derivados altamente costosos y necesarios industrialmente. La FES es la mejor vía para diseñar un proceso fermentativo para la producción de enzimas FAE utilizando materiales lignocelulósicos y hongos filamentosos.

Bibliografía

- [1] SANNIGRAHI, P. *et al.* "Cellulosic Biorefineries unleashing Lignin Opportunities". *Environ. Sustainability*. 2010, 2, pp. 383–393.
- [2] CASTAÑEDA, R. E. *et al.* "Proteínas que remodelan y degradan la pared celular vegetal: perspectivas actuales". *Biot. Aplicada*. 2011, 28, pp. 194-204.
- [3] DEEPAK, R. *et al.* "Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review". *Bioresource Technol.* 2009, 100, pp. 1515–1523.
- [4] JUODEIKIENE, G. *et al.* "The use of Xylanase for increasing the Efficiency of Biocatalytic Conversion of Crop Residues to Bioethanol". *Catal. Today*. 2011, 167, pp. 113-121.
- [5] SOCCOL, C. R. *et al.* Bioethanol from Lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technol.* 2010, 101, pp. 4820–4825.

- [6] CHEN, H. *et al.* "Key Technologies for Bioethanol Production from Lignocellulose". *Biotechnology Advances*. 2010, pp. 556-562.
- [7] XU, J. *et al.* "Bermuda Grass as Feedstock for Biofuel Production: A Review". *Bioresource Technol.* 2011, 102, pp. 7613-7620.
- [8] RAZMOVSKI, R. *et al.* "Ethanol Production from Sugar Beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an Alginate-maize Stem Ground Tissue Matrix". *Enzyme and Microbial Technol.* 2011, pp. 48, 378-385.
- [9] DOUGLAS, J. B. *et al.* "Plant Cell Walls to Ethanol". *Biochem J.* 2012, 442, pp. 241-252.
- [10] QURESHI, N. *et al.* "Production of Butanol (a Biofuel) from Agricultural Residues: Part I – Use of Barley Straw Hydrolysate". *Biomass and bioenergy*. 2010, 34, pp. 559-565.
- [11] SAHA, B. C. *et al.* "Ethanol Production from Wheat Straw by recombinant *Escherichia Coli* strain FBR5 at High Solid Loading". *Bioresource Technol.* 2011, p. 102.
- [12] PRINSEN, P. "Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas". España: Instituto de Recursos Naturales y Agrología de Sevilla, 2010.
- [13] YUE, Q. *et al.* "Feruloyl and Acetyl esterase Production of an Anaerobic Rumen Fungus *Neocallimastix* sp. YQ2 effected by Glucose and Soluble Nitrogen Supplementations and its Potential in the Hydrolysis of Fibrous feedstuffs". *Animal Feed Sci and Technol.* 2009, 153, pp. 263-277.
- [14] SALGADO, J. M. *et al.* "Purification of Ferulic Acid solubilized from Agroindustrial Wastes and Further conversion into 4-vinyl Guaiacol by *Streptomyces setonii* using SSF". *Industrial Crops and Products*. 2012, 39, pp. 52- 61.
- [15] BALCERZAK, M. *et al.* "The Feruloyl Esterase Gene Family of *Fusarium Graminearum* is Differentially regulated by Aromatic Compounds and Hosts". *Fungal biology*. 2012, 16, pp. 478-488.
- [16] ZHANG, S. *et al.* "Identification of Amino Acid Residues Responsible for increased Thermostability of Feruloyl Esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC Algorithm". *Bioresource Technol.* 2011, pp. 2093-2096.
- [17] FAZARY, A. E. *et al.* "Expression of Feruloyl Esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: Characterization and Crystal Studies of the Recombinant Enzyme". *International J of Biological Macromolecules*. 2010, 46, pp. 440-444.
- [18] ESAKKIRAJ, P. *et al.* "Solid-state Production of Esterase using Fish Processing Wastes by *Bacillus altitudinis* AP-MSU". *Food and bioproducts processing*. 2012, 293, p. 7.
- [19] FUCIÑOS, P. *et al.* "Production and Characterization of Two N-terminal truncated Esterases from *Thermophilus HB27* in a Mesophilic yeast: Effect of N-terminus in Thermal Activity and Stability". *Protein Expression and Purification*. 2011, 78, pp. 120-130.
- [20] YANG, H. *et al.* "Selection and Characteristics of a Switchgrass-colonizing Microbial Community to produce Extracellular Cellulases and Xylanases". *Bioresource Technol.* 2011, 102, pp. 3546-3550.
- [21] PÉREZ-MORALES, G. G. *et al.* "Selección de cepas de hongos filamentosos con actividad FAE y pectinasa". XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Iztapalapa, México, 2008.
- [22] MUKHERJEE, G. *et al.* "Ferulic Acid esterase production by *Streptomyces* sp.". *Bioresource Technol.* 2007 98, 2011-2013.
- [23] SHI, J. *et al.* "Effect of Microbial Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Cotton Stalks for Ethanol Production". *Biomass and bioenergy*. 2009, 33, pp. 88-96.
- [24] VAFIADI, C. *et al.* "Feruloyl Esterase-catalysed Synthesis of Glycerol Sinapate using Ionic Liquids Mixtures". *J of Biotechnol.* 2009, 139, pp. 124-129.
- [25] MARTINS, S. *et al.* "Bioactive Phenolic Compounds: Production and Extraction by SSF. A Review". *Biot Advances*. 2011, 29, pp. 365-373.
- [26] SARANGI, P. K. *et al.* "Enhancing the Rate of Ferulic Acid Bioconversion using Different Carbon Sources". *J of Brewing and Distilling*. 2011, 2, pp. 1-4.
- [27] TSUCHIYAMA, M. *et al.* "Esterification of Ferulic Acid with Polyols using a Ferulic Acid Esterase from *Aspergillus niger*". *Biochem et Biophysica Acta*. 2006, 1760, pp. 1071-1079.
- [28] BRIENZO, M. *et al.* "Enzymology of the Thermophilic Ascomycetous Fungus *Thermoascus aurantiacus*". *Fungal biology reviews*. 2008, 22, pp. 120-130.
- [29] PRATES, J. A. *et al.* "The Structure of the Feruloyl Esterase Module of Xylanase 10B from *Clostridium thermocellum* Provides Insights into Substrate Recognition". *Structure*. 2001, 9, pp. 1183-1190.
- [30] GOTTSCHALK, L. M. *et al.* "Cellulases, Xylanases, Glucosidase and Ferulic Acid esterase produced by *Trichoderma* and *Aspergillus* act Synergistically in the Hydrolysis of Sugarcane Bagasse". *Biochem Eng J.* 2010, 51, pp. 72-78.
- [31] DUSTED-MENDOZA, J. C. *et al.* "Aplicación de balances de masa y energía al proceso de FES de bagazo de caña de azúcar con *Aspergillus niger*". *Biot Aplicada*. 2004, 21, pp. 85-91.
- [32] KO, J. K. *et al.* "Ethanol Production from Rice Straw using Optimized Aqueous-ammonia Soaking Pretreatment and Simultaneous Saccharification and Fermentation Processes". *Bioresource Technol.* 2009, 100, pp. 4374-4380.
- [33] ZENG, W. *et al.* "Air Pressure Pulsation SSF of Feruloyl Esterase by *Aspergillus niger*". *Bioresource Technol.* 2009, 100, pp. 1371-1375.

- [34] GIRIO, F. M. *et al.* "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review". *Bioresource Technol.* 2010, 101, pp. 4775–4800.
- [35] BALAT, M. "Production of Bioethanol from Lignocellulosic Materials Via the Biochemical Pathway: A Review". *Energy Conversion and Management.* 2011, 52, pp. 858–875.
- [36] TALEBNIA, F. *et al.* "Production of Bioethanol from Wheat Straw: An Overview on Pretreatment, Hydrolysis and Fermentation". *Bioresource Technol.* 2010, 101, pp. 4744–4753.
- [37] MAACHE-REZZOUG, Z. *et al.* "Optimizing Thermomechanical Pretreatment Conditions to Enhance Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw by Response Surface Methodology". *Biomass and Bioenergy.* 2011, 35, pp. 3129–3138.
- [38] FANG, X. *et al.* "Status and Prospect of Lignocellulosic Bioethanol Production in China". *Bioresource Technol.* 2010, 101, pp. 4814–4819.
- [39] CRISTOV, L. P. *et al.* "Esterases of Xylan-degrading Microorganisms: Production, Properties, and Significance". *Enzyme Microb Technol.* 1993, 15.
- [40] BONNIN, E. *et al.* "*Aspergillus niger* I-1472 and *Pycnoporus cinnabarinus* MUCL39533, selected for the Biotransformation of Ferulic Acid to Vanillin, are also Able to produce Cell Wall Polysaccharide-degrading enzymes and Feruloyl Esterases". *Enzyme and Microb Technol.* 2001, 28, pp. 70–80.
- [41] TOPAKAS, E. *et al.* "Microbial Production, Characterization and Applications of Feruloyl Esterases". *Process Biochem.* 2007, 42, pp. 497–509.
- [42] HINZ, S. W. *et al.* "Hemicellulase Production in *Chrysosporium lucknowense* C1. *J of Cereal Sci.* 2009, 50, pp. 318–323.
- [43] MANDALARI, G. *et al.* "Production of Feruloyl Esterases and Xylanases by *Talaromyces stipitatus* and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on Industrial Food Processing by-products". *Bioresource Technol* 2008, 99, pp. 5130–5133.
- [44] SZWAJGIER, D. *et al.* "Production of Extracellular Ferulic Acid Esterase by *Lactobacillus* Strains using Natural and Synthetic Carbon Sources". *Acta Sci Pol, Technol Aliment.* 2011, 10, pp. 287–302.
- [45] XIROS, C. *et al.* "Factors Affecting Ferulic Acid Release from Brewer's Spent Grain by *Fusarium Oxysporum* Enzymatic System". *Bioresource Technol.* 2009, 100, pp. 5917–5921.
- [46] MATHEW, S. *et al.* "Studies on the Production of Feruloyl Esterase from Cereal Brans and Sugar Cane Bagasse by Microbial Fermentation". *Enzyme and Microbial Technol.* 2005, 36, pp. 565–570.
- [47] FAULDS, C. B. *et al.* "Influence of Ferulic Acid on the Production of Feruloyl Esterases by *Aspergillus niger*". *FEMS Microbiology Letters.* 1997, 157, pp. 239–244.
- [48] FAULDS, F. C. *et al.* "The Role of Hydroxycinnamates in the Plant Cell Wall". *J Sci Food Agric.* 1999, 79, pp. 393–395.
- [49] MANCERA, T. *et al.* "Extracción enzimática de los ácidos hidroxixinámicos de la pulpa de café". *Congreso nacional de biotecnología y bioingeniería.* Mexico, 2008.
- [50] GARCÍA, B. L. *et al.* "Induction of Ferulic Acid Esterase and Xylanase Activities in *Streptomyces avermitilis* UAH30". *FEMS Microbiology Letters.* 1998, 158, pp. 95–99.
- [51] YU, P. "Enzymic Release of Reducing Sugars from Oat Hulls by Cellulase, as Influenced by *Aspergillus* Ferulic Acid Esterase and *Trichoderma* Xylanase". *Agric and food chemistry.* 2003, 51, pp. 218–233.
- [52] TOPAKAS, E. *et al.* "Purification and Characterization of a Feruloyl Esterase from *Fusarium Oxysporum* Catalyzing Esterification of Phenolic Acids In ternary Water Organic Solvent Mixtures". *J of Biotechnology.* 2003, 102, pp. 33–44.
- [53] HUANG, Y. *et al.* "Production of Ferulic Acid from Lignocellulolytic Agricultural Biomass by *Thermobifida fusca* Thermostable Esterase produced in *Yarrowia lipolytica* Transformant". *Bioresource Technol* 2011, 102, pp. 8117–8122.
- [54] THÖRN, C. *et al.* "Immobilization of Feruloyl Esterases in Mesoporous Materials Leads to Improved Transesterification Yield". *J of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 2011, 72, pp. 57–64.
- [55] ASTHER, M. I. *et al.* "Feruloyl Esterase from *Aspergillus niger* a Comparison of the Production in Solid State and Submerged Fermentation". *Process Biochem.* 2002, 38, pp. 685–691.
- [56] TOPAKAS, E. *et al.* "*Sporotrichum* Thermophile Type C feruloyl Esterase (StFaeC): Purification, Characterization, and its use for Phenolic Acid (Sugar) Ester synthesis". *Enzyme and Microbial Technol.* 2005, 36, pp. 729–736.
- [57] CHEN, H. Z. *et al.* "A Novel Industrial-level Reactor with Two Dynamic Changes of Air for SSF". *J Biosci Bioeng.* 2002, 93, pp. 211–214.
- [58] XU, F. J. *et al.* "Effect of Periodically Dynamic Changes of Air on Cellulase Production in SSF". *Enzyme Microbiol Technol.* 2002, 30, pp. 45–48.