

Índice de contenido.....	iii
Índice de Tablas.....	ix
Índice de Figuras	xi
Glosario de abreviaturas y símbolos.....	xiii
Resumen / Abstract.....	xv
Justificación.....	xix
Hipótesis.....	xxii
Objetivos.....	xxiii
Objetivos general.....	xxiii
Objetivos particulares.....	xxiii
Introducción General.....	xxiv
1. Fundamentación.....	1
1.1. Hongos.....	3
1.1.1 Aislamiento y clasificación de hongos.....	4
1.1.2 Hongos filamentosos.....	5
1.1.3 Condiciones de cultivo.....	5
1.1.3.1 Nutrientes utilizados para el crecimiento de hongos.....	5
1.1.3.2 Formulación del medio de cultivo.....	6
1.1.4 Hongos con aplicaciones industriales.....	7
1.1.5 Hongos aislados del café (pulpa y cascarilla).....	8
1.2 Ácidos fenólicos.....	9
1.2.1 Ácidos Fenólicos presentes en los residuos del café.....	10
1.2.2 Propiedades biológicas de los ácidos fenólicos.....	11
1.2.2 Propiedades biológicas de derivados naturales y sintéticos del ácido cafeico.....	11
1.3 Procesos fermentativos para la producción de enzimas.....	12
1.3.1 Fermentación sumergida o líquida.....	13
1.3.2 Fermentación en medio sólido.....	13
1.3.2.1 Ventajas y desventajas de la FMS con respecto a la FS.....	14
1.3.2.2 Tipos de fermentadores para FMS	15
1.3.2.2.1 Biorreactor en columna.....	17

1.3.2.2.2 Biorreactor en columna estéril.....	18
1.3.2.2.3 Biorreactor en columna-charola.....	19
1.3.2.2.4 Biorreactor Growtek.....	20
1.3.2.2.5 Biorreactor en proceso continuo.....	20
1.3.2.2.6 Biorreactor tambor horizontal.....	21
1.3.2.2.7 Biorreactor Zymotis.....	22
1.3.2.2.8 Biorreactor Biocon.....	23
1.3.2.2.9 Biorreactor de lecho fluidizado.....	24
1.4 Enzimas.....	25
1.4.1 Clasificación de la enzimas.....	27
1.4.1.1 Lipasas.....	28
1.4.1.1.1 Estructura.....	29
1.4.1.1.2 Mecanismo de acción.....	29
1.4.1.1.3 Aplicaciones industriales de las lipasas.....	31
1.4.1.1.3.1 Síntesis de ésteres fenólicos catalizados por lipasas.....	32
1.4.1.2 Tanasas.....	33
1.4.1.2.1 Aplicaciones industriales de las tanasas.....	34
1.4.1.3 Feruloil esterases.....	35
1.4.1.3.1 Clasificación de FAEs.....	36
1.4.1.3.2 Aplicaciones de las FAEs en biotecnología.....	38
1.4.1.4 Clorogenato esterases.....	38
1.4.2 Purificación de enzimas.....	40
1.4.2.1 Métodos para la purificación de proteínas.....	41
1.4.2.2 Purificación intermedia de proteínas.....	42
1.4.2.3 Pulido de proteínas.....	43
1.5 Métodos de búsqueda y selección para carboxil éster hidrolasas.....	43
1.5.1 Métodos clásicos de búsqueda y selección.....	44
1.5.1.1 Métodos de búsqueda y selección para lipasas.....	44
1.5.1.2 Métodos de búsqueda y selección para tanasas.....	45
1.5.1.3 Métodos de búsqueda y selección para FAEs.....	45
1.5.1.4 Métodos de búsqueda y selección para CEs.....	46

1.5.2 Métodos de selección de alto rendimiento.....	46
1.5.2.1 Métodos de SAR para lipasas.....	47
1.5.2.2 Métodos de SAR para tanasas.....	47
1.5.2.3 Métodos de SAR para FAEs.....	47
1.5.2.4 Métodos de SAR para clorogenato esterasas.....	48
2. Materiales y Métodos.....	49
2.1 Microorganismos.....	51
2.1.1 Aislamiento y conservación de cepas.....	51
2.1.1.1 Identificación de cepas fúngicas.....	51
2.2 Producción de clorogenato esterasas.....	52
2.2.1 Soportes y sustratos sólidos para las fermentaciones.....	52
2.2.1.1 Bagazo de caña.....	52
2.2.1.2 Residuos del café.....	52
2.2.2 Producción de esterasas por FMS.....	53
2.2.2.1 Solución de oligoelementos empleada en el medio de cultivo.....	54
2.2.3 Dispositivo de FMS.....	55
2.2.4 Extracción enzimática del medio de FMS.....	55
2.3 Técnica analíticas.....	56
2.3.1 Preparación de la muestra.....	56
2.3.2 Cuantificación simultánea de la actividad tanasa, feruloil y clorogenato esterasa.....	56
2.3.3 Determinación de actividad clorogenato esterasa por espectrofotometría.....	57
2.3.4 Cuantificación de la actividad lipasa.....	58
2.3.5 Determinación de proteína.....	59
2.3.5.1 Preparación del reactivo de azul de Coomassie.....	59
2.3.5.2 Curva estándar de proteína.....	59
2.4 Purificación de la clorogenato esterasa.....	60
2.4.1 Extracción por percolación.....	60
2.4.1.1 Tratamiento del extracto fermentado de la FMS.....	61
2.4.2 Métodos cromatográficos para separación de proteínas.....	61
2.4.2.1 Cromatógrafo utilizado para la purificación de clorogenato esterasa.....	62

de <i>A. ochraceus</i>	
2.4.2.2 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	62
2.4.2.3 Cromatografía de intercambio iónico.....	63
2.4.2.4 Cromatografía de exclusión por tamaño molecular (filtración en gel).....	64
2.4.2.5 Determinación del peso molecular.....	65
2.4.3 Electroforesis.....	66
2.4.3.1 Electroforesis SDS-PAGE.....	66
2.4.3.1.1 Preparación del gel de poliacrilamida.....	68
2.4.3.1.2 Preparación de las muestras para la electroforesis.....	68
2.4.3.1.3 Marcadores de peso molecular.....	66
2.4.3.1.4 Realización de la electroforesis.....	69
2.4.3.2 Electroforesis en condiciones nativas.....	70
2.4.3.3 Tinción de geles con Azul de Coomassie.....	70
2.4.3.4 Tinción de geles con plata.....	71
2.4.4 Zimograma.....	72
2.5 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad y estabilidad de la enzima.....	72
2.6 Efecto de diversos efectores sobre la actividad.....	73
Resultados.....	75
3. Implementación de un método de <i>screening</i> para la selección de cepas productoras de esterasas.....	77
3.1 Identificación de los hongos.....	79
3.2 Validación del método.....	81
3.3 Método para la detección simultánea de las actividades feruloil esterasa, tanasa y clorogenato esterasa.....	86
3.4 Conclusiones.....	90
4. Producción selectiva de clorogenato esterasa por fermentación en medio sólido...	91
4.1 Caracterización de la pulpa y cascarilla de café.....	92
4.2 Efecto de la composición del medio de cultivo sobre la síntesis de clorogenato esterasa.....	95

4.3 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad clorogenato esterasa.....	98
4.4 Efectos de la temperatura y pH sobre la actividad clorogenato esterasa y la estabilidad en el extracto crudo.....	99
4.5 Hidrólisis enzimática del ácido clorogénico presente en los residuos del café.....	101
4.5 Conclusiones.....	102
5. Purificación y caracterización bioquímica de la enzima clorogenato esterasa.....	105
5.1 Purificación de clorogenato esterasa.....	107
5.1.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica.....	107
5.1.2 Cromatografía de intercambio iónico.....	109
5.1.3 Cromatografía de exclusión.....	110
5.1.4 Estudio de purificación.....	111
5.1.5 Análisis de electroforesis.....	111
5.1.6 Zimograma.....	112
5.2 Caracterización bioquímica.....	114
5.2.1 Filtración en gel.....	114
5.2.2 Influencia de la Temperatura sobre la actividad y estabilidad de la CE de <i>A. ochraceus</i>	116
5.2.3 Influencia del pH sobre la actividad y estabilidad de la CE de <i>A. ochraceus</i>	118
5.2.4 Efecto de iones metálicos, detergentes e inhibidores sobre la actividad clorogenato esterasa.....	118
5.3 Conclusiones.....	120
Conclusiones Generales.....	121
Perspectivas.....	127
Bibliografía.....	131
Anexos.....	143
Artículo: <i>A New Microplate Screening Method for the Simultaneous Activity Quantification of Feruloyl Esterases, Tannases, and Chlorogenate Esterases</i>	145