

## Optimización del proceso de tratamiento enzimático de la flor del cempasúchil para la extracción de xantofilas.

Claudia, L. Rangel-Cruz, J. Enrique Botello-Álvarez, Hugo Jimenez-Islas, Ramiro Rico-Martínez, José Luis Navarrete-Bolaños\*.

*Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico s/n, C.P. 38010. Celaya, Gto., México.*

E-mail: jlnb@itc.mx.

**Palabras clave:** tratamientos enzimáticos, flor del cempasúchil, extracción de xantofilas.

### RESUMEN

Estudios previos han demostrado que el tratamiento enzimático de flores de cempasúchil con extractos de enzimas producidos *in situ* por *Rhizopus nigricans* permite obtener harinas con contenido de xantofilas por arriba de cualquier otro método de tratamiento. Sin embargo, a pesar ello y más allá de los problemas de escalamiento frecuentemente asociado al mezclado, el tratamiento enzimático no es económicamente viable de ser escalado debido a los costos de proceso, especialmente en la producción del extracto enzimático. En este estudio, se diseñó un medio de cultivo [harina de papa (8.2 g/L), sacarosa (12.4 g/L) y celulosa (0.5 g/L)] y optimizaron las variables [33°C de temperatura, aireación de 1.2 VVM y agitación de 50 rpm] que maximizan la obtención de extractos enzimáticos con actividad de celulasas, y las variables [33°C de temperatura y 196 rpm de agitación] asociadas al tratamiento enzimático que maximizan el contenido de xantofilas en harinas. Los resultados mostraron que usando el medio de cultivo diseñado a condiciones óptimas permite obtener harinas con un contenido de xantofilas del 95% (promedio) mayor comparado con el control (flor sin tratar) en 20 min de tiempo de tratamiento y rendimientos del 98% (promedio) en la extracción de xantofilas totales. Valores que, comparados con los publicados, representan una reducción del 93% (promedio) en el tiempo de tratamiento, del 50% en el número de etapas en la

extracción y del 98% (promedio) en el costo del medio de cultivo, lo que permite un ahorro significativo en los requerimientos de servicios e insumos que inciden directamente en el costo de proceso.

**Keywords:** enzymatic treatments, marigold flower, xanthophylls extraction

### ABSTRACT

Previous studies have demonstrated that the enzymatic treatment of marigold flowers with enzyme extracts produced *in situ* from *Rhizopus nigricans* allow to obtain flours with xanthophylls content higher than any other treatment method. However, despite these results, and beyond the scale-up problems frequently associated to mixing, the enzymatic treatment is not economically viable to be scaled-up due to the process cost, in particular the enzymatic extract production. In this study, a culture medium was designed [potato flour (8.2 g/L), sucrose (12.4 g/L) and cellulose (0.5 g/L)], the variables that maximize the yield for the enzymatic extract with cellulase activity was determined [33°C of temperature, 1.2 VVM of aeration, and 50 rpm of agitation], as well as the variables associated to the enzymatic treatment that maximize the content of xanthophylls in flours [33°C of temperature and 196 rpm of agitation]. The results show that using the designed culture medium, and the aforementioned optimal conditions, leads to obtain flours with a xanthophylls content 95% (average) higher than the control (flowers without treatment) in 20 min of treatment

processing time and yielding a 98% (average) on total xanthophylls extraction. Values that, when compared with the previously published results, represent a reduction of 93% (average) on treatment time, 50% on number of stages required

---

in the extraction, and 98% (average) in culture medium cost, allowing significant savings on both operational cost and raw materials, directly affecting the overall process economy.

---

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, a nivel industrial, la flor de cempasúchil es utilizada para la obtención de harina y oleoresina (mezcla de xantofilas esterificadas con ácidos grasos) que es destinada a dos grandes mercados: (1) materia prima en la formulación de alimentos balanceados destinados a la avicultura, para alcanzar el nivel de pigmentación requerido por el consumidor que es asociado a la calidad e inocuidad de los productos que de ellos se obtienen, y (2) obtención de xantofilas puras para ser usadas como aditivos en la formulación de alimentos de consumo directo para el humano o en suplementos nutricionales debido a su capacidad antioxidante, incrementar la capacidad de respuesta del sistema inmunológico, prevenir el cáncer y la degeneración de la macula (Seddon *et al.*, 1994; Fullmer & Shao, 2001). Efectos benéficos que originaron el desarrollo de procesos para la producción de xantofilas basadas en Síntesis Química y Tecnología de Fermentaciones (Gierhart, 1994; Krieienbuhl *et al.*, 2000; Jacobson *et al.*, 2000). Sin embargo, ninguno de estos procesos, reportan producciones de xantofilas en cantidad y calidad comparable al proceso de obtención a partir de la flor del cempasúchil. En breve el proceso tradicional para la obtención de xantofilas de flor del cempasúchil incluye: ensilado, secado, pelletizado, lixiviación, destilación, saponificación y purificación o integración, dependiendo del fin del producto. Esto es, la purificación se realiza cuando los productos se comercializan como aditivos alimentarios o farmacéuticos, y la integración se realiza cuando los productos se comercializan como aditivos para

la formulación de alimentos balanceados (Ausich & Sanders, 1997; Khachik, 2001; Madhavi & Kagan, 2002; Navarrete-Bolaños *et al.*, 2005). De las operaciones unitarias implicadas en el proceso de obtención, el ensilado es la etapa crítica que determina el rendimiento global del proceso al limitar la eficiencia de la lixiviación y registrar pérdidas hasta del 30% de xantofilas. Durante el ensilado los microorganismos saprofitos asociados al cempasúchil sintetizan enzimas hidrolíticas que degradan el material estructural de la pared celular de los pétalos de la flor que favorece la extracción de xantofilas (Navarrete- Bolaños *et al.*, 2003). Con base a ello, se desarrollaron métodos de tratamientos enzimáticos como alternativa para incrementar los rendimientos de la extracción y sustituir la etapa del ensilado (Delgado-Vargas & Paredes-López, 1997; Barzana *et al.*, 2002; Navarrete-Bolaños *et al.*, 2004). Los resultados mostraron que es posible obtener harinas de flor de cempasúchil con un contenido mayor al 100% de xantofilas con respecto a su contenido original (Delgado-Vargas & Paredes-López, 1997; Barzana *et al.*, 2002; Navarrete-Bolaños *et al.*, 2004) e incrementos en el rendimiento de la extracción (Barzana *et al.*, 2002; Navarrete-Bolaños *et al.*, 2004; Navarrete-Bolaños *et al.*, 2005). De estos, el tratamiento enzimático con extractos obtenidos *in situ* por el metabolismo de *R. nigricans* permite obtener harinas con un contenido de xantofilas de 29.24 g/Kg de harina (peso seco) en 5 h de tratamiento (Navarrete-Bolaños *et al.*, 2004), valor de concentración similar al obtenido por el tratamiento enzimático usando enzimas comerciales (Econase-cep, que es una preparación

de endo-1,4- $\beta$ -D-glucanasa, celobiohidrolasa, y exo-1,4- $\beta$ -D-glucosidasa) en 120 h de tratamiento (Delgado-Vargas & Paredes-López, 1997) pero con una reducción significativa en el tiempo de tratamiento requerido. Así mismo, se demostró que el tratamiento enzimático con extractos obtenidos *in situ* por *R. nigricans* presenta el valor mayor del coeficiente de transferencia de masa ( $K_c a$ ), que implica mayor eficiencia en la lixiviación (Navarrete-Bolaños *et al.*, 2005). Sin embargo y a pesar de estos resultados, el tratamiento enzimático de flor de cempasúchil con extractos obtenidos *in situ* de *R. nigricans* no es económicamente viable de ser escalado debido al costo de su producción, al realizarse usando medio de cultivo comercial (caldo papa dextrosa, PDB Difco Lab. Sparks. MD 21152 USA) que tiene un costo promedio de \$2.50 por gramo y se requieren 24 g para producir un litro de extracto enzimático, lo que implica un costo promedio de \$ 60.00 pesos por litro. Por otro lado, se tiene la limitante en el rendimiento de producción *in situ* de enzimas por hongos filamentosos al presentar un desarrollo morfológico de crecimiento natural en forma compacta que limita los mecanismos de difusión para la transferencia de masa entre los componentes del medio de cultivo y el microorganismo. En este contexto se ha demostrado que el desarrollo y crecimiento morfológico esta basado en las condiciones hidrodinámicas en las que opera el sistema de reacción o biorreactor y que la producción de enzimas se ve favorecida cuando el microorganismos crece en forma dispersa o en pequeños aglomerados (Botello-Alvarez *et al.*, 2006). Con base a lo anterior, en este estudio se analizaron los componentes del medio de cultivo comercial (PDB) a fin de diseñar uno más económico que permita la producción de extractos enzimáticos *in situ* por *R. nigricans* con actividad de celulasas equiparable al obtenido usando PDB. Así mismo, se analizaron y optimizaron las variables de operación (temperatura, aire y agitación) para maximizar la producción *in situ* de extractos

enzimáticos con actividad celololítica y las variables asociadas al tratamiento enzimático (temperatura y agitación) para maximizar el contenido de xantofilas en harinas tratadas de flor del cempasúchil. En todos los casos de estudio, los ensayos experimentales fueron realizados en biorreactores a nivel laboratorio (7 L) y el análisis, cuantificación y optimización de variables fue efectuada usando técnicas estadístico-matemático basadas en experimentos diseñados estadísticamente. El objetivo de estos estudios fue el desarrollo de un proceso técnica y económicamente viable para el tratamiento enzimático de flor de cempasúchil que permita obtener harinas con alto contenido de xantofilas e incrementar la eficiencia de su extracción en la lixiviación.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### *Flor de cempasúchil.*

Un lote de flor de cempasúchil (*Tagetes erecta*) de un mismo cultivo fue usado para todos los experimentos. El lote contenía flores con coloración amarillo-naranja en relación de 10:90 y 30% promedio en peso en el receptáculo.

#### *Microorganismo.*

*Rhizopus nigricans*, hongo filamentoso aislado de la flor de cempasúchil fue empleado como inóculo para la producción del extracto enzimático de acuerdo a Navarrete-Bolaños *et al.* (2003 y 2004).

#### *Obtención del extracto enzimático.*

Estudios previos han demostrado que las enzimas hidrolíticas producidas por *R. nigricans* son excretadas al medio de cultivo (Navarrete-Bolaños *et al.*, 2003). Por lo tanto, para evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de enzimas *in situ* por *R. nigricans*, el hongo fue sembrado en tubo inclinado conteniendo agar papa dextrosa (PDA; Difco Lab. Sparks. MD 21152 USA) e incubado a 28°C por 24 h y propagado a 28 °C y 100 rpm en un agitador-

incubador orbital (Forma Scientific, model 4520) en caldo papa dextrosa (PDB; Difco Lab. Sparks. MD 21152 USA) y medios de cultivo líquidos formulados con diferentes composiciones para efectos de evaluación de componentes y diseño de un medio de cultivo económico para la producción de extractos enzimáticos por *R. nigricans*. En cada ensayo experimental de propagación, el producto fue filtrado, colectado el sobrenadante y evaluado con base a su capacidad para reducir la viscosidad de soluciones de Carboximetil celulosa (Fluka Biochemka, Sigma-Aldrich Chemie GMBH, Steiheim Germany).

### *Enzima comercial.*

Celulasa comercial sintetizada por *Aspergillus niger* con actividad de endo-1,4-β-D-glucanasa (5000 U, Sigma Chemical Co., San Luis, MO.) fue utilizada con fines comparativos para evaluar la actividad de los extractos enzimáticos producidos *in situ* y determinar la actividad de la enzima sintetizada de acuerdo a Navarrete-Bolaños *et al.* (2003 y 2004).

### *Carboximetil celulosa (CMC).*

Soluciones de carboximetil celulosa al 5.25% (p/v) fueron preparadas obteniéndose una viscosidad promedio de 2400 cp y usadas para evaluar la actividad enzimática con base a la reducción de la viscosidad (Brookfield digital rheometer model DV-III+) de acuerdo a Navarrete-Bolaños *et al.* (2003 y 2004).

### *Actividad enzimática.*

Alícuotas de 10 mL de extracto enzimático se adicionaron a 150 mL de solución de CMC (5.25% (p/v)). Las mezclas enzima-CMC se colocaron a condiciones constantes de temperatura a 28° C y 175 rpm en un agitador-incubador orbital (Forma Scientific, model 4520) por 24 h. Las soluciones resultantes fueron evaluadas para determinar la actividad enzimática como función de la reducción

de la viscosidad de la solución (Navarrete-Bolaños *et al.*, 2003 y 2004).

### *Análisis de componentes del medio de cultivo.*

Con base al contenido del medio de cultivo comercial (PDB) se realizaron y diferentes formulaciones con fécula de papa, tapioca, almidón de maíz, harina de maíz, papa deshidratada, extractos de papa, glucosa, fructosa, sacarosa y dextrosa. Además, se adicionó celulosa (sustrato) como un tercer componente para analizar si la enzima es inducible o constitutiva. El análisis y cuantificación de los componentes en las formulaciones fueron realizadas usando estrategias experimentales basados en experimentos diseñados estadísticamente con valores de variables definidas con base a la formulación del medio comercial (4 g. de almidón de papa y 20 g de dextrosa) y pequeñas cantidades de celulosa.

### *Análisis de variables para producción de extractos enzimáticos en biorreactores.*

Para evaluar las variables y niveles de operación que maximizan la actividad de extractos enzimáticos basado en la síntesis de enzimas hidrolíticas en biorreactores se seleccionaron las variables A: temperatura (29-35°C); B: flujo de aire (1.15-3.5 VVM (volumen de aire por volumen de medio) y la C: agitación (50-100 rpm), con base a su relación con la transferencia de masa y calor, implicados en el crecimiento microbiano, transformación de sustrato y síntesis del producto. Los niveles de operación fueron establecidos con base a estudios previos de escrutinio. Seleccionadas las variables y sus niveles, se construyó un esquema experimental de tipo Box-Behnken para ajustar los resultados experimentales a modelos matemáticos de segundo orden. En todos los ensayos experimentales se mantuvieron constantes la concentración inicial del inóculo en (0.12 g/L (promedio)) y el volumen del medio de cultivo (2.0 L), y sin control del pH.

### *Análisis de variables para el tratamiento enzimático en biorreactores.*

A fin de cuantificar las variables del tratamiento enzimático en biorreactores para maximizar el contenido de xantofilas en los productos tratados, se consideraron las variables A: Temperatura y B: agitación. Variables asociadas a la actividad enzimática (temperatura) e interacción enzima-sustrato inducida por mecanismos convectivos (agitación) e inactivación por esfuerzo de corte. Los niveles de operación para cada variable fueron establecidos en A: 32-36 °C y B: 160-40 rpm, con base a estudios previos de escrutinio de variables. Seleccionadas las variables y sus niveles, se construyó un esquema experimental de composición central para ajustar los resultados experimentales a modelos matemáticos de segundo orden. En todos los ensayos experimentales se mantuvo constante la relación flor-extracto enzimático en 1-32 (p-v).

### *Obtención de harinas.*

Muestras de flor de cempasúchil tratadas con el extracto enzimático fueron filtradas y separadas las fases sólida (pétalos) y líquida (extracto enzimático). En todos los casos, las muestras sólidas fueron secadas bajo condiciones suaves de temperatura (55°C) en una estufa de vacío (Sep lab. Modelo 1430) hasta alcanzar un contenido de humedad del 10% ( $\pm 1$ ) en promedio. Parte de muestras secas fueron molidas para obtener una harina con un tamaño de partícula promedio de 0.372 mm (al pasar por malla No. 40 y retenidas por malla No. 60), recomendado para realizar los análisis de concentración de xantofilas totales en harinas (método 970.64 del AOAC, 1984).

### *Estrategia de optimización de variables.*

En todos los casos de estudio, el análisis de las variables independientes fue realizado usando métodos estadístico-matemáticos con base a modelos matemáticos de segundo orden construidos por el algoritmo de mínimos cuadrados.

La caracterización del punto estacionario que maximiza la variable de respuesta o función de salida fue calculada usando análisis de regresión múltiple mediante la generación de un sistema de ecuaciones diferenciales obtenidas del modelo construido. La solución al sistema fue computada usando métodos numéricos basados en el algoritmo de Newton-Rhaphson (Montgomery, 2005) y para fines de comprobación de los resultados que maximizan las funciones de salida se usó el método de optimización vía IMSL v 4.01 de la librería del software FORTRAN (Visual Numerics, Inc).

### *Especificación de la variable de respuesta o función de salida.*

Dos funciones de salida fueron evaluadas para la optimización del proceso. Para la optimización del medio de cultivo y el la producción de extractos de extractos enzimáticos en biorreactores la variable de respuesta evaluada fue la actividad enzimática en los extractos obtenidos, y para la optimización del tratamiento enzimático la variable de respuesta fue la concentración de xantofilas en harinas tratadas de flor del cempasúchil.

### *Sistema de fermentación.*

Biorreactores de tipo tanque agitado de diferentes capacidades fueron utilizados para la producción de extractos enzimáticos y el tratamiento de la flor del cempasúchil. A nivel laboratorio un biorreactor automatizado con capacidad de 7 L (ADI autoclavable bioreactor, Aplikkon Dependable Instruments, Schiedam, Netherlands) fue utilizado tanto para la optimización del medio de cultivo, el análisis de variables para la producción de extractos enzimáticos y el tratamiento enzimático. Para las pruebas de escalamiento se utilizó un biorreactor con capacidad de 100 L propiedad de Prodemex, y uno de 1500 L propiedad de AVT Thomas para las pruebas industriales.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Análisis de componentes del medio de cultivo.*

A fin de diseñar un medio de cultivo económicamente viable para la producción de extractos enzimáticos por *R. nigricans*, diversos esquemas experimentales de composición central para tres variables ( $X_1$ = fécula de papa, tapioca, almidón de maíz, harina de maíz, papa deshidratada o extractos de papa;  $X_2$ = glucosa, fructosa, sacarosa o dextrosa;  $X_3$ =celulosa) fueron realizados. De estos, los medios de cultivo formulados a base de fécula de papa, tapioca, almidón de maíz, harina de maíz, extractos de papa, glucosa, fructosa y dextrosa mostraron una escasa producción de biomasa y baja capacidad para disminuir la viscosidad de las soluciones de CMC, que es directamente correlacionado a la actividad de celulasas en los extractos. En contraparte, los medios de cultivo formulados con harina de papa, sacarosa y celulosa presentaron buen desarrollo de biomasa y sus extractos enzimáticos la mayor actividad para reducir la viscosidad de soluciones de CMC similar a la actividad enzimática de extractos obtenidos usando el medio de cultivo comercial PDB (72.1%). Con base a ello, se diseñó un esquema experimental de composición central (Tabla 1) para evaluar las variables:  $X_1$ =Harina;  $X_2$ =Sacarosa;  $X_3$ = celulosa, con niveles de  $X_1$ : (7-9 g/L);  $X_2$ : (11-13 g/L) y  $X_3$ : (0.5-1.5 g/L). Realizados los ensayos

experimentales, los resultados obtenidos (ultima columna de la tabla 1), fueron usados para describir la relación existente entre las variables independientes ( $X_1, X_2, X_3$ ) y la actividad del extracto enzimático, evaluada por el cambio en la viscosidad de soluciones de CMC (Y), mediante la construcción de un modelo matemático polinomial de segundo orden construido usando el método de mínimos cuadrados. Como resultado, el siguiente modelo fue obtenido.

$$Y = -620.7 + 54.3 X_1 + 77.1 X_2 - 12.2 X_3 - 2.6 X_1^2 - 1.0 X_1 X_2 + 1.5 X_1 X_3 - 2.8 X_2^2 + 0.6 X_2 X_3 - 7.4 X_3^2$$

La ecuación supone implícitamente que la dependencia de la variable de respuesta (actividad enzimática) con respecto a los factores es no lineal y que los efectos de los factores son aditivos. El modelo fue usado para establecer la localización del óptimo al ubicar en un sistema multidimensional el punto de convergencia de las variables, que se obtiene al generar un sistema de ecuaciones lineales resultante de derivar parcialmente cada variable:

$$\frac{\partial [Y]}{\partial X_1} = 54.3 - 5.2 X_1 + 1.0 X_2 + 1.5 X_3 = 0$$

$$\frac{\partial [Y]}{\partial X_2} = 77.1 - 1.0 X_1 - 5.6 X_2 + 0.6 X_3 = 0$$

$$\frac{\partial [Y]}{\partial X_3} = -12.2 + 1.5 X_1 + 0.6 X_2 - 14.8 X_3 = 0$$

**Tabla 1.** Diseño de composición central para el análisis de componentes en el medio de cultivo.

Ensayo	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1^*$
1	8.0	12.0	1.0	72.6
2	7.0	11.0	0.5	63.5
3	9.0	11.0	0.5	69.5
4	7.0	13.0	0.5	67.6
5	9.0	13.0	0.5	67.2
6	7.0	11.0	1.5	55.2
7	9.0	11.0	1.5	61.9
8	7.0	13.0	1.5	58.1

9	9.0	13.0	1.5	63.1
10	6.31821	12.0	1.0	64.8
11	9.68179	12.0	1.0	73.1
12	8.0	10.3182	1.0	60
13	8.0	13.6818	1.0	76.7
14	8.0	12.0	0.159104	78.3
15	8.0	12.0	1.8409	63.7
16	8.0	12.0	1.0	72.01

\*Porcentaje de actividad enzimática

La solución al sistema de ecuaciones, obtenida usando el método de Newton-Raphson, establece que los valores de las variables que maximizan la actividad de celulasas en los extractos enzimáticos son:  $X_1 = 8.2$  g/L;  $X_2 = 12.4$  g/L; y  $X_3 = 0.5$  g/L. El procedimiento descrito indica que la producción de enzimas se maximiza cuando el medio de cultivo esta formado con 8.2 g/L de harina de papa, 12.4 g/L de sacarosa y 0.5 g/L de celulosa. El ensayo experimental de comprobación mostró que el extracto enzimático obtenido presentan una capacidad de reducir la viscosidad de una solución de CMC del 75% en promedio, valor que se compara favorablemente contra el valor teórico predicho (75.5%) por modelo matemático y el valor obtenido usando el medio de cultivo comercial PDB (72.1%).

#### Optimización de variables para la producción de extractos enzimáticos.

Diseñado el medio de cultivo, se analizaron las variables de operación (A=temperatura; B=aireación y C=agitación) en biorreactores para maximizar la actividad de celulasas en extractos enzimáticos *in situ* por *R. nigricans*, mediante un esquema experimental de tipo Box-Behnken (Tabla 2) para niveles de A: (26-32°C); B: (1.15-3.5 VVM) y la C: (50-100 rpm). En todos los ensayos se uso el

medio de cultivo optimizado y se mantuvieron constantes la concentración inicial del inóculo (0.12 g/L (promedio)), relación 1-20 entre el volumen del medio y el volumen del inóculo, sin control del pH, y la morfología del cultivo iniciador fue de forma pelletizada (pequeñas esferas). Nuevamente, los resultados obtenidos (ultima columna de la tabla 2), fueron usados para describir la relación existente entre las variables independientes (temperatura; Aireación y agitación) y la actividad de celulasas, evaluada por el cambio en la viscosidad de soluciones de CMC ( $Y_1$ ), mediante la construcción de un modelo matemático polinomial de segundo orden vía mínimos cuadrados. Como resultado, el siguiente modelo fue obtenido.

$$Y_1 = -845.25 + 55.35 A + 41.75 B - 1.15 C - 0.84A^2 - 1.06 AB + 0.04 AC - 3.8 B^2 + 0.16 BC - 0.003 C^2$$

Siguiendo el procedimiento descrito, el modelo se utilizó para generar un sistema de ecuaciones lineales resultante de derivar parcialmente cada variable:

$$\frac{\partial[Y_1]}{\partial A} = 55.35 - 0.7056A - 1.06B + 0.04C = 0$$

$$\frac{\partial[Y_1]}{\partial B} = 41.75 - 1.06A - 14.44B + 1.06C = 0$$

$$\frac{\partial[Y_1]}{\partial C} = -1.15 + 0.04A + 0.16B + 0.000009C = 0$$

**Tabla 2.** Diseño de Box-Behnken para el análisis de variables para la producción de extractos enzimáticos.

Ensayo	A	B	C	Y*
1	29	1.15	75	46
2	32	1.15	100	56
3	32	2.325	75	74
4	35	1.15	75	74
5	35	3.5	75	69
6	32	1.15	50	70
7	32	2.325	75	73
8	32	3.5	50	68
9	29	3.5	75	56
10	32	2.325	75	75
11	32	3.5	100	73
12	35	2.325	50	71
13	29	2.325	100	53
14	29	2.325	50	72
15	35	2.325	100	62

\*Porcentaje de actividad enzimática

Nuevamente, la solución al sistema de ecuaciones, obtenida usando el método de Newton-Raphson, establece que los valores de las variables que maximizan la concentración de celulasas en los extractos enzimáticos son: A = 33°C; B = 1.2 VVM; y C=50 rpm. El procedimiento descrito indica que la producción de enzimas se maximiza cuando las condiciones de operación en bioreactores tipo tanque agitado son fijadas constantes en los valores de 33°C de temperatura, aireación de 1.2 VVM y agitación de 50 rpm. El ensayo experimental de comprobación mostró que el extracto enzimático obtenido presenta una capacidad de reducir la viscosidad de una solución de CMC del 78% (promedio), valor que se compara favorablemente contra el valor teórico predicho (77.6%) por el modelo matemático. Adicionalmente se realizaron ensayos experimentales en estas condiciones optimizadas usando PDB como medio de cultivo, los resultados mostraron una capacidad de reducir la viscosidad de una solución de CMC del 69.1% (promedio), que es menor a la actividad alcanzada usando el medio de cultivo optimizado.

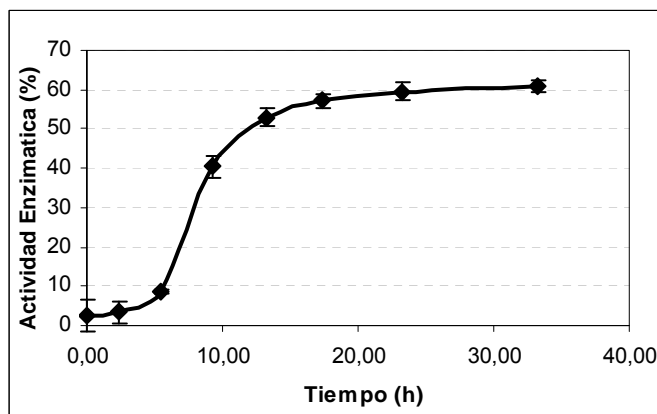
Aparentemente esta diferencia en la actividad enzimática a favor en los ensayos con el medio optimizado es el resultado del tipo de crecimiento morfológico del hongo que es en forma dispersa y contrasta con el desarrollo morfológico en forma compacta en los ensayos usando PDB como medio de cultivo.

#### *Cinéticas de producción de extractos enzimáticos.*

Definidas las condiciones de operación que maximizan la producción de extractos enzimáticos y diseñado el medio de cultivo, se realizaron estudios cinéticos a fin de establecer el tiempo de proceso. Los resultados mostraron un incremento gradual en la producción de enzimas hidrolíticas hasta alcanzar su máximo a las 24 h de proceso, a tiempos posteriores la actividad del extracto no mostró cambios significativos (figura 1). Además, el análisis visual del proceso mostró que el crecimiento del hongo es en forma de micelio disperso a pesar de que el inoculo inicial tenía morfología de forma de pellets. Con base a lo anterior, el tiempo de proceso para la producción de extractos enzimáticos fue definido en 24 h.



**Fig. 1.** Cinética de producción de enzimas hidrolíticas y desarrollo morfológico del hongo *R. nigricans*.



*Optimización de variables para el tratamiento enzimático.*

Establecidas las condiciones que maximizan la actividad de celulasas en extractos enzimáticos producidos *in situ* por *R. nigricans*, se analizaron las variables de operación en biorreactores

(D=temperatura y E=agitación) bajo un esquema experimental de composición central para niveles de D: (32-36°C) y E: (160-240 rpm). En todos los ensayos experimentales se mantuvo constante la relación flor-extracto enzimático en 1-32 (p-v). Nuevamente, los resultados (última columna de la Tabla 3) fueron utilizados para describir la relación existente entre las variables independientes (D, E) y la concentración de xantofilas (Xt) mediante la construcción de un modelo matemático polinomial de segundo orden vía mínimos cuadrados. Como resultado, el siguiente modelo fue obtenido.

$$Xt = -102.14 + 6.49D + 0.18E - 0.09D^2 - 0.003DE - 0.0004E^2$$

Nuevamente, La localización del óptimo se definió por el generar un sistema de ecuaciones basado en ecuaciones diferenciales parciales:

$$\frac{\partial [Xt]}{\partial D} = 6.49 - 0.18D - 0.003E = 0$$

$$\frac{\partial [Xt]}{\partial E} = 0.18 - 0.003D + 0.00000016E = 0$$

**Tabla 3.** Diseño de composición central y resultados para tratamiento enzimático.

Ensayo	A: Temperatura	B: Agitación	[Xt]*
1	34	200	27.93
2	32	160	26.12
3	36	160	26.72
4	32	240	26.68
5	36	240	26.25
6	31,17	200	25.97
7	36,82	200	26.43
8	34	143,43	26.37
9	34	256,56	26.24
10	34	200	26.07

\* Concentración de xantofilas totales [g de xantofilas/kg de harina (base seca)]

La solución del sistema de ecuaciones, fue obtenida basado en el método de Newton-Raphson, y establece que los valores óptimos son: D=34 y B=196. El procedimiento indica que el tratamiento

enzimático en condiciones de temperatura de 33°C y agitación de 196 rpm se maximiza el contenido de xantofilas en harinas tratadas. El ensayo experimental de comprobación mostró que el

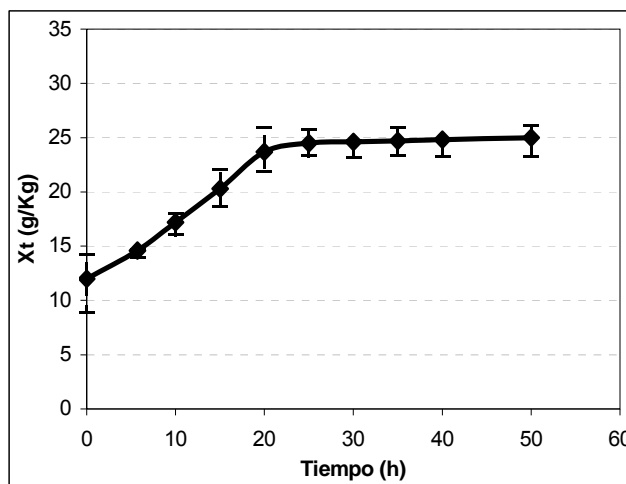
tratamiento enzimático en biorreactores a las condiciones optimas permite obtener harinas con un contenido de xantofilas de 26.8 g/kg (base seca), valor que se compara favorablemente contra el valor teórico predicho [27.0 g de xantofilas por kg de harina (base seca)] por el modelo matemático.

*Cinéticas de tratamiento enzimático.*

Con estos resultados se realizaron estudios de tratamiento enzimático y se evaluó el cambio en el contenido de xantofilas en harina tratadas con respecto al tiempo, a fin de establecer el tiempo de tratamiento. Los resultados mostraron un incremento en el orden del 100% en el contenido de xantofilas en muestras tratadas durante los primeros 25 min de tratamiento (Fig. 2) con respecto al control (muestra sin tratar). Tiempos posteriores de tratamiento mostraron incrementos no significativos en el contenido de xantofilas en las harinas tratadas. Además, la inspección visual del proceso mostró la presencia de partículas finas de los pétalos suspendidas en el sobrenadante a los 10 min de tratamiento y que son resultado de la actividad hidrolítica de las enzimas presentes en el extracto, fenómeno similar al observado y descrito por Navarrete-Bolaños *et al.* (2004). A tiempos posteriores, se observó un incremento gradual en el material sólido suspendido, y aproximadamente a los 120 min de tratamiento la degradación alcanza su máximo y la máxima cantidad de xantofilas en el producto tratado es alcanzada. Sin embargo, el balance de masa muestra que la diferencia en el contenido de xantofilas en muestras tratadas a 25 y 120 min es del 5% (promedio), y un balance de tiempo muestra una diferencia del 85%(promedio). Además, el análisis del proceso en las operaciones posteriores al tratamiento enzimático mostraron que las harinas tratadas hasta 120 min retienen mayor humedad y dificulta la operación de secado debido a la desintegración total de la estructura de la flor por efecto de la actividad enzimática. Adicionalmente, el análisis del proceso de extracción en las muestras tratadas a 20 y 120 min

no mostró cambios significativos en la eficiencia de recuperación de xantofilas. Con base a lo anterior, el tiempo de tratamiento de la flor del cempasúchil en biorreactores fue establecido en 25 min.

**Fig. 2.** Cinética de tratamiento enzimático a flores del cempasúchil a condiciones óptimas.



*Ensayos a nivel planta piloto e industrial.*

Definido el medio de cultivo, las condiciones para la producción de extractos enzimáticos y del tratamiento enzimático de la flor del cempasúchil que permiten obtener harinas con alto contenido de xantofilas, se realizó la producción de extractos enzimáticos y el tratamiento de flor en biorreactores de 100 y 1000 Ls. La secuencia de operaciones implicada en la producción de extractos enzimáticos por escala incluye: el cultivo del hongo *Rhizopus n*, en tubo inclinado conteniendo agar papa dextrosa (Difco) e incubado a 28°C por 24 h. La biomasa de cada tubo es colectada y transferida a matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de PDB (Difco) e incubados a 28°C y 100 rpm en un incubador agitador orbital (Forma Scientific, modelo 4520), condiciones que inducen el crecimiento del hongo en forma de pelletz. El producto obtenido es el inoculo iniciador y es transvasado al biorreactor de laboratorio (7 L), conteniendo el medio de cultivo diseñado (8.2 g/L de harina de papa, 12.4 g/L de sacarosa y 0.5 g/L de celulosa), en relación 1:20

(v/v) y condiciones de proceso a 33°C, 1.20 VVM de aireación y 50 rpm de agitación (valores óptimos), manteniéndose constantes durante 24 h. Nuevamente, el producto obtenido del biorreactor es el inoculo iniciador y es transvasado al biorreactor planta piloto (100 L) conteniendo medio de cultivo diseñado en relación 1:20 (v/v), a este nivel se ajustaron las variables de operación para la aireación (1.8 VVM) y agitación (100 rpm), manteniéndose constante la temperatura (33°C), después de 24 h de proceso, el producto obtenido fue filtrado y recuperado el sobrenadante (extracto enzimático) que fue utilizado para realizar ensayos de tratamiento enzimático.

Para los ensayos a nivel planta industrial, biorreactores de 1500 L, se sigue el mismo procedimiento hasta la planta piloto, donde el producto (biomasa y sobrenadante) es el inoculo iniciador y es transvasado al biorreactor (1500 L) conteniendo el medio de cultivo diseñado en relación 1:20 (v/v), ajustando nuevamente las variables de aireación (2.4 VVM) y agitación (150 rpm) manteniendo constante la temperatura (33°C), después de 24 h de proceso, el producto obtenido fue filtrado y recuperado el sobrenadante (extracto enzimático) que fue utilizado para realizar ensayos de tratamiento enzimático. Los ensayos de tratamiento enzimático en flor de cempasúchil, independiente del nivel de escala (piloto o industrial) fue realizado a condiciones de operación constantes de temperatura (34°C) y agitación (196 rpm) (valores óptimos) y tiempo de tratamiento de 25 min. En todos los procesos realizados, las harinas obtenidas presentaron un contenido de xantofilas del 95% (promedio) mayor con respecto al control y una eficiencia de recuperación del 98% (promedio) en la etapa de lixiviación con hexano. Estudios de extracción en etapas múltiples mostró que la recuperación de xantofilas en las harinas tratadas requiere sólo la mitad de las etapas utilizadas en harinas de cempasúchil sin tratamiento enzimático. Los resultados obtenidos, mostraron al proceso desarrollado como

económicamente viable y factible para la extracción de xantofilas totales de la flor del cempasúchil.

### CONCLUSIONES

Un protocolo experimental técnica y económicamente más viable que cualquier otro proceso previamente descrito para el tratamiento enzimático de flor de cempasúchil con extractos de enzimas producidos *in situ* por *R. nigricans* ha sido desarrollado. En este, harinas con alto contenido de xantofilas (95% promedio mayor del contenido original) en periodos cortos de tiempo de tratamiento (20 min) pueden ser obtenidas. Además, las harinas tratadas permiten la recuperación del 98% (promedio) de xantofilas en un sistema de lixiviación a contracorriente usando sólo la mitad de las etapas requeridas comúnmente. Adicional al incremento significativo en el contenido de xantofilas en harinas tratadas, la reducción en el tiempo de tratamiento y en el número de etapas en la operación de lixiviación permite un ahorro significativo en los requerimientos de servicios que inciden directamente en el costo de proceso. Si a ello se le adiciona la producción de extractos enzimáticos *in situ* por *R. nigricans* en medios de cultivo no comerciales de bajo costo (harina de papa (8.2 g/L), sacarosa (12.4 g/L) y celulosa (0.5 g/L)) con alta actividad celulolítica, se acentúa el impacto en el costo-eficiencia del proceso desarrollado. Características que muestran al proceso descrito en este estudio como la mejor alternativa de tratamiento de flor de cempasúchil para la extracción de xantofilas comparado con cualquier otro proceso previamente desarrollado.

### REFERENCIAS

- AOAC (1984) Official Methods of Analysis, 14th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- Ausich RL & Sanders DJ (1997) Process for the formation, isolation and purification of

- comestible xanthophyll crystals from plants. USA Patent 5648564.
- Bárcana E, Rubio D, Santamaría RI, García-Correa O, García F, Ridaura-Sanz VE & López-Munguía A (2002) Enzyme-Mediated Solvent Extraction of carotenoids from marigold Flower (*Tagetes erecta*)". *J. Agric. Food Chem.* 50:4491-4496.
- Botello-Alvarez JE, Pérez-Castrejón S, Jiménez-Islas H, Rico-Martínez R & Navarrete-Bolaños JL (2006) Hydrodynamic analysis and inoculum effect on *Rhizopus nigricans* growth for cellulase production in bubbling column bioreactor. *In: Modern Applied Microbiology*. Mendez-Vilas (Ed). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp 221-226.
- Fullmer LA & Shao A (2001) The role of lutein in eye health and nutrition. *Am. Assoc. Cereal Chem.* 46: 408-413.
- Gierhart DL (1994) Zeaxanthin-containing compositions produced by *Flavobacterium multivorum*. USA Patent 5427783.
- Jacobson G K, Jolly SO, Sedmak JJ, Skatrud TJ & Wasileski JM (2000) Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma* method for their cultivation and their use in animal feeds. USA Patent 6015684.
- Khachik F (2001) Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants. USA Patent 6262284.
- Kreienbuhl P, Rudin P & Rudolph W (2000) Method of making carotenoides. USA Patent 6150561.
- Madhavi DL & Kagan DI (2002). Process for the isolation of mixed carotenoids from plants. USA Patent 6380442.
- Montgomery DC (2005) Response surface methods and designs. *In: Design and analysis of experiments*. Montgomery DC (ed). John-Wiley & Sons, NewYork.
- Navarrete-Bolanos JL, Rangel-Cruz CL, Jimenez-Islas H, Botello-Alvarez E & Rico-Martinez R (2005) Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Res. Intern.* 38: 159-165.
- Navarrete-Bolaños JL, Jiménez-Islas H, Botello-Alvarez E & Rico-Martínez R (2004) Improving xanthophylls extraction from marigold flower using cellulolytic enzymes. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3394-3398.
- Navarrete-Bolaños JL, Jiménez-Islas H, Botello-Alvarez E & Rico-Martínez R. (2003) Mixed culture optimization for marigold flower ensilage via experimental design and response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2206-2211.
- Delgado-Vargas F & Paredes-López O (1997) Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles. *J. Agric. Food Chem.* 45: 1097-1102.
- Seddon JM, Ajani UA, Sperduto RD, Hiller R, Blair N, Burton TC, Farber MD, Gragoudas ES, Haller J, Miller DT, Yannuzzi LA & Willett W (1994) "Dietary carotenoids, vitamins A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. A multicenter study. *J. Am. Med. Assoc.* 272: 1413-1420.