



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química

Programa de Posgrado en Alimentos del
Centro de la Republica (PROPAC).

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

CARACTERIZACIÓN DE LA FERMENTACIÓN EN ESTADO
SÓLIDO DE LA FLOR DEL CEMPOALXOCHITL.

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M. EN C. JOSÉ LUIS NAVARRETE BOLAÑOS

Dirigido por:

Dr. OCTAVIO PAREDES LÓPEZ

SINODALES

Dr. OCTAVIO PAREDES LÓPEZ
PRESIDENTE

Dr. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ
SECRETARIO

Dr. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ
VOCAL

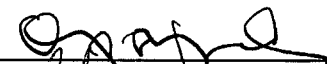
Dr. VÍCTOR OLALDE PORTUGAL
VOCAL

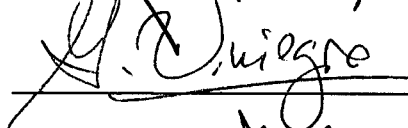
Dr. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA
VOCAL

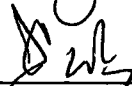
Dra. OFELIA MORA AGUIRRE
SUPLENTE

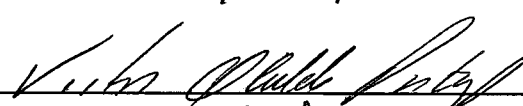
Dr. FRANCISCO DELGADO VARGAS
SUPLENTE

M.C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES
Director de la Facultad de Química

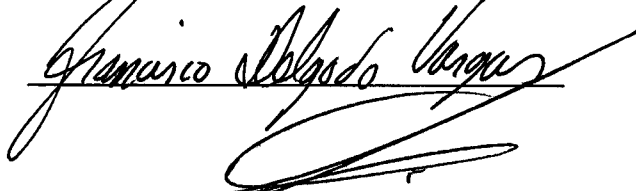












Dr. SERGIO QUESADA ALDANA
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Santiago de Querétaro Qro.
Septiembre, 2004
México

BIBLIOTECA CENTRAL UAQ

No. Adq. H69637

No. Título _____

Clas TS

547.29

N321c

Ej. 1

RESUMEN

La flor del cempoalxochitl (*Tagetes erecta*) es la principal fuente natural para la obtención comercial de xantofilas, principalmente luteína, por lixiviación con hexano. Sin embargo, la eficiencia de su extracción esta condicionada al tratamiento previo dado a la flor. A nivel industrial, la flor del cempoalxochitl es ensilada para depolimerizar los componentes de su pared celular, mediante a la actividad enzimática de la microbiota endógena, y facilitar la transferencia de masa entre el material sólido y el solvente durante la lixiviación. El conocimiento parcial del ensilado de la flor del cempoalxochitl y el alto valor agregado de los componentes que de esta fuente se obtienen dio origen al desarrollo de procesos de pre-tratamiento, basados en enzimas celulolíticas, para incrementar los rendimientos de la extracción. Los resultados de estos estudios son, sin lugar a duda, mejores a los obtenidos por el método tradicional del ensilado. Sin embargo, es probable que el avance en el conocimiento del proceso del ensilado proporcione nuevas alternativas de pre-tratamiento para incrementar la eficiencia de la extracción. Con base a lo anterior, en el presente trabajo se analizó, desde una perspectiva de fermentación en estado sólido, el proceso de ensilado de la flor del cempoalxochitl. Como parte del trabajo, se analizó la microbiota asociada a la flor, se optimizaron las variables en fermentación, se evaluó el extracto enzimático sintetizado por los microorganismos endógenos significativos en el ensilado y se simuló el comportamiento de distribución de xantofilas durante la extracción con hexano. Los resultados muestran a las bacterias *Flavobacterium* I1b, *Acinetobacter anitratus* y al hongo *Rhizopus nigricans* con actividad enzimática significativa para depolimerizar los componentes de la pared celular de la flor y se encontró que un inóculo mixto de estos microorganismos en un sistema de fermentación a las condiciones óptimas permiten obtener harinas con un contenido de xantofilas mayor en un 65% en promedio con respecto al valor promedio del ensilado comercial. Las harinas pueden ser lixiviadas con hexano en un sistema a contracorriente de siete etapas y recuperar el 95.7 % de las xantofilas. Así mismo, se encontró que el extracto enzimático sintetizado por estos microorganismos permite obtener harinas con similar concentración de xantofilas comparadas con las obtenidas por métodos de tratamientos enzimáticos a base de enzimas comerciales, con ventajas adicionales con base a costos de proceso al obtener *in situ* el extracto enzimático y reducir sustancialmente el tiempo de tratamiento hasta en un 95%.

SUMMARY

Marigold flower (*Tagetes erecta*) is the main natural source for commercial xanthophylls extraction, mainly lutein, via lixiviation with hexane. However, the extraction efficiency is closely tied to the pre-treatment given to the flower. At the industrial level, the marigold flower is ensilaged to achieve structural wall cell degradation, through endogenous microbiota enzymatic activity, facilitating the mass transfer between solid material and solvent during the lixiviation. Partial knowledge of the marigold flower ensilage and the high aggregated value of the components obtained motivated the development of pre-treatment processes, based on cellulolytic enzymes, to increase extraction yields. These studies lead, without any doubt, to better results than those obtained by the traditional silage method. However, the advance in the ensilage process knowledge may translate into new pre-treatment alternatives to increase the extraction efficiency. Based on the above, the present work analyzes, from a solid state fermentation view, the marigold flower ensilage process. As a part of this work, the microbiota associated with the flower was analyzed, fermentation variables were optimized, enzymatic extract synthesized by endogenous microorganisms significant in the silage was evaluated, and behaviour of xanthophylls distribution during the hexane extraction was simulated. The results show that the bacteria *Flavobacterium I1b*, *Acinetobacter anitratus* and the fungi *Rhizopus nigricans* exhibit important enzymatic activity to depolymerise the wall cell components of the flower, and it was found that a mixed inoculum of these microorganisms, in a fermentation system at the optimum conditions, allows to obtain flours with xanthophylls content 65% higher on average with respect to the average value of the commercial silage. These flours can be lixiviated with hexane in a seven stage counter current system leading to 95.7% recovery of xanthophylls. Likewise, it was found that the enzymatic extract synthesized by these microorganisms allows obtaining flours with similar xanthophylls concentration compared to those obtained by enzymatic treatments based on commercial enzymes, with additional advantages regarding process costs reduction since the enzymatic extract is obtained *in situ*, and substantially reduce treatment time as far as 95%.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioingeniería del Departamento de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Celaya, bajo la dirección del Dr. Octavio paredes López, Investigador del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato y Asesor Científico del Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la Republica (PROPAC).

AGRADECIMIENTOS

Por medio de la presente expreso mi más sincero reconocimiento al Dr. Octavio Paredes López por sus valiosos comentarios, pláticas y ayuda para llevar a buen termino el presente trabajo.

Al Dr. Gustavo Viniegra González, por quien sin su orientación no hubiera sido posible estructurar el contenido del presente trabajo.

Al resto del comité de sinodales:

Dr. Carlos Regalado González
Dr. Víctor Olalde Portugal
Dr. Eduardo Bárzana García
Dra. Ofelia Mora Aguirre
Dr. Francisco Delgado Vargas

Por su gran apoyo técnico-científico, su valiosa colaboración y aportaciones en la revisión de este trabajo.

De igual manera se extiende el agradecimiento a las siguientes instituciones:

- * Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Química, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos.
- * Instituto Tecnológico de Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica.
- * Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A todas aquellas Personas que de alguna forma contribuyeron en la desarrollo y culminación de este trabajo, que por el hecho de no citarlas no significa que no sean importantes.

A todos GRACIAS.

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 4.1.	Contenido de xantofilas en algunos materiales	17
Cuadro 4.2	Carotenoides reportados para distintas variedades de flor del cempoalxochitl (porcentaje de carotenoides)	19
Cuadro 4.3	Análisis de HPLC en oleorresina de flor del cempoalxochitl	20
Cuadro 4.4	Análisis del estándar de HPLC de oleorresina	45
Cuadro 9.1	Parámetros característicos de la ecuación de Leudeking-Piret a partir de datos experimentales	66
Cuadro 9.2	Diseño de mezclas para extractos enzimáticos de microorganismos con mayor actividad celulolítica	67
Cuadro 9.3	Diseño de mezclas tipo escrutinio para todos los microorganismos de interés en la extracción de xantofilas totales	70
Cuadro 9.4	Análisis de varianza para el diseño de mezclas tipo escrutinio	71
Cuadro 9.5	Diseño de mezclas de <i>centroide simplex</i>	73
Cuadro 9.6	Análisis de varianza para el diseño de <i>centroide simplex</i>	73
Cuadro 9.7	Resultados de experimentos realizados para el diseño $2^{4-1} + 1C$	78
Cuadro 9.8	Análisis de varianza para los resultados del diseño $2^{4-1} + 1C$	79
Cuadro 9.9	Análisis de varianza para el modelo de primer orden	80
Cuadro 9.10	Ensayos realizados con base al camino de etapa ascendente	81
Cuadro 9.11	Resultados de experimentos realizados para el segundo diseño $2^{4-1} + 1C$	81
Cuadro 9.12	Análisis de varianza para los resultados del segundo diseño $2^{4-1} + 1C$	82
Cuadro 9.13	Análisis de varianza del modelo de primer orden para los resultados del segundo diseño $2^{4-1} + 1C$	83
Cuadro 9.14	Ensayos realizados con base al camino de la etapa ascendente para el segundo modelo lineal	84
Cuadro 9.15	Diseño de Box-Behnken y resultados de rendimiento	85
Cuadro 9.16	Resultados de la extracción de xantofilas totales del diseño $2^{4-1} + 3C$	102

Cuadro 9.17	Análisis de varianza para el diseño $2^{4-1} + 3C$	103
Cuadro 9.18	Análisis de varianza para el modelo de primer orden	104
Cuadro 9.19	Ensayos experimentales realizados para incrementar la concentración de xantofilas en la extracción con base al camino de la etapa ascendente	104
Cuadro 9.20	Diseño de Box-Behnken y resultados obtenidos de cada ensayo Distribución porcentual de xantofilas totales por etapas	105

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 4.1. Ruta biosintética para la formación de geranyl-geranyl pirofosfato a partir del isopentil pirofosfato	4
Figura 4.2. Ruta biosintética para la formación de licopeno a partir de geranyl-geranyl pirofosfato	5
Figura 4.3. Ruta biosintética para la formación de β -caroteno a partir de licopeno	6
Figura 4.4. Estructuras típicas de oxicarotenoides acumulados en plantas	7
Figura 4.5. Espectros de cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrofotometría de los perfiles de algunos oxi-carotenos	9
Figura 4.6. Reacción de Wittig para la síntesis química de carotenoides	14
Figura 4.7. Cromatograma de xantofilas lixiviadas de la flor de cempoalxochitl	21
Figura 4.8. Corte transversal de la pared celular vegetal	29
Figura 4.9. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa	30
Figura 4.10. Equipos comunes utilizados en fermentación en estado sólido	36
Figura 4.11. Esquema general para la caracterización de un proceso de FES	38
Figura 8.1. Estándar de oleorresina de flor de cempoalxochitl	45
Figura 8.2. Esquema del diseño del sistema de fermentación de fase sólida	47
Figura 8.3. Representación del sistema de múltiples etapas a contracorriente (sistema de Shanks)	59
Figura 9.1. Desarrollo de micro-biota nativa de flor de cempoalxochitl fresca y fermentada	60
Figura 9.2. Características microscópicas de cinco bacterias aisladas como cultivos puros	61
Figura 9.3. Observaciones macro y microscópicas del hongo H1	62
Figura 9.4. Observaciones macro y microscópicas del hongo H2	63
Figura 9.5. Cambios en la viscosidad de soluciones de CMC por efecto del extracto crudo enzimático (ϵ)	64
Figura 9.6. Cinéticas de crecimiento y síntesis de celulasa en cultivos por	65

	lote.	
Figura 9.7.	Cambios de viscosidad como función del tiempo de cultivo	66
Figura 9.8.	Contornos de superficie de respuesta estimada a partir del modelo de orden cúbico especial	69
Figura 9.9.	Contornos de superficie de respuesta estimada del modelo de segundo orden	75
Figura 9.10.	Contornos de respuesta estimada a partir del modelo de segundo orden	86
Figura 9.11.	Cromatograma de HPLC de oleorresina extraída de harina de flor fermentada	88
Figura 9.12.	Comparación de la actividad de celulasa del hongo <i>Rhizopus nigricans</i> contra Endo- β -1-4-glucanasa de <i>Aspergillus niger</i>	91
Figura 9.13.	Efecto del tratamiento enzimático sobre en la extracción de xantofilas en sistemas agitados	93
Figura 9.14.	Efecto del tratamiento enzimático es sistemas usando el extracto enzimático crudo sobre pétalos frescos	94
Figura 9.15.	Efecto del tratamiento enzimático en la concentración de xantofilas sobre pétalos frescos para sistemas no agitados	95
Figura 9.16.	Efecto del tratamiento enzimático sobre la composición de los pétalos	97
Figura 9.17.	Esquema de tratamiento con FND y FAD para llevar a cabo la depolimerización de la célula y separar sus componentes estructurales	98
Figura 9.18.	Cromatograma de HPLC de la oleorresina saponificada que se obtuvo como producto final de la harina de flor de cempoalxochitl tratada con el extracto enzimático	100
Figura 9.19.	Contornos de superficie de respuesta estimada con el modelo de segundo orden	107
Figura 9.20.	Cinética de la extracción de xantofilas totales de harina de flor de cempoalxochitl con hexano	108

CONTENIDO

	Pág.
I. RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE GENERAL	ix
II. INTRODUCCIÓN	xiv
III. JUSTIFICACIÓN	xvi
IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
4.1. Cempoalxochitl	2
4.2. Usos y aplicaciones	3
4.3. Xantofilas	3
4.3.1. Comercio internacional	10
4.3.2. Demanda mundial y tendencias de suministro de harina y oleorresina de flor de cempoalxochitl	11
4.4. Alternativas viables de producción	13
4.4.1. Síntesis Química	13
4.4.2. Tecnología de fermentaciones	15
4.4.3. Fuentes naturales	17
4.4.3.1. Caracterización de componentes de flor de cempoalxochitl	18
4.4.3.2. Oleorresina de flor de cempoalxochitl de producción nacional	20
4.5. Métodos para la obtención de xantofilas a partir de flor de cempoalxochitl	22
4.6. Métodos o alternativas para la obtención de harina de flor de Cempoalxochitl	22
4.6.1. Extracción con fluidos supercríticos	23
	ix

4.6.2. Tratamientos enzimáticos	24
4.6.3. Extracción con solventes	26
4.6.4. Lixiviación con hexano	27
4.6.5. Fermentación en estado sólido (FES); consideraciones generales	31
4.6.5.1. Microorganismos	32
4.6.5.2. Sustratos	32
4.6.5.3. Factores ambientales	33
4.6.5.4. Contenido de humedad y actividad de agua (A_w)	34
4.6.5.5. Temperatura y transferencia de calor	34
4.6.5.6. Aireación	35
V. HIPÓTESIS	39
5.1. hipótesis experimental	39
5.2. Hipótesis nula	39
VI. OBJETIVOS	40
6.1. Objetivo general	40
6.2. Objetivos específicos	40
VII. METODOLOGÍA	41
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	43
8.1. Materiales	43
8.1.1. Materia prima: flor de cempoalxochitl	43
8.1.2. Harina de flor de cempoalxochitl	43
8.1.3. Oleorresina de flor de cempoalxochitl	43
8.1.4. Extracción y cuantificación de xantofilas totales	44
8.1.5. Estándar de oleorresina de flor de cempoalxochitl	44
8.1.6. Microorganismos	44
8.1.7. Sistema de fermentación de fase sólida	46

8.1.8. Celulasa comercial	46
8.2. Métodos de análisis	48
8.2.1. Aislamiento de microorganismos	48
8.2.2. Identificación de bacterias	48
8.2.3. Identificación de hongos	48
8.2.4. Determinación de xantofilas totales en harina de flor de cempoalxochitl	49
8.2.5. Determinación de xantofilas totales de la oleorresina de flor de cempoalxochitl	50
8.2.6. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	51
8.2.7. Estudios cinéticos	51
8.2.8. Determinación de biomasa, método del peso seco	52
8.2.9. Obtención del extracto crudo de enzima	52
8.2.10. Evaluación de la actividad enzimática	52
8.2.11. Propagación de cultivos microbianos	52
8.2.12. Efecto del tratamiento enzimático	53
8.2.13. Análisis de la actividad enzimática residual	53
8.2.14. Estudio de ensilado de la flor de cempoalxochitl	53
8.3. Métodos matemáticos	54
8.3.1. Modelo cinético de crecimiento y formación de producto	54
8.4. Estrategias experimentales	55
8.4.1. Estrategia para la optimización de variables	55
8.4.2. Diseño de mezclas para análisis de microorganismos y actividad enzimática	55
8.4.3. Optimización del inóculo	56
8.4.4. Modelos matemáticos par diseños de mezclas	56
8.4.5. Estrategia experimental en fermentación de fase sólida	56
8.4.6. Optimización de variables en fermentación de fase sólida	57
8.4.7. Estrategia experimental para la obtención de datos de equilibrio y el prediseño de procesos	58
8.4.8. Extracción de xantofilas a contracorriente: sistema de Shanks	58
8.4.9. Especificación de la variable de respuesta o dependiente	59

8.4.10. Análisis estadístico	59
IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
9.1. Análisis de los microorganismos asociados al cempoalxochitl	60
9.1.1. Microorganismos	60
9.1.1.1. Análisis de bacterias	60
9.1.1.2. Identificación de bacterias	61
9.1.1.3. Análisis e identificación de hongos	62
9.2. Caracterización del sistema biológico	64
9.2.1. Estudios cinéticos, crecimiento y actividad enzimática	64
9.2.2. Efectos simbióticos o antagónicos. Diseños de cultivo mixto	67
9.2.3. Ensayos de ensilado: diseño de mezcla “escrutinio”	68
9.2.4. Optimización de cultivos mixtos en el ensilado de la flor de Cempoalxochitl	72
9.2.5. Conclusiones parciales	76
9.3. Especificación y características del sistema biológico a utilizar para la fermentación de la flor de cempoalxochitl	77
9.4. Fermentación en fase sólida	77
9.4.1. Conclusiones parciales	89
9.5. Caracterización de la celulasa sintetizada por los microorganismos asociados al cempoalxochitl	90
9.5.1. Análisis de actividad de la enzima endo- β -1-4-glucanasa	90
9.6 Tratamientos enzimáticos	92
9.6.1 Efecto del tratamiento enzimático en la extracción de xantofilas	92
9.6.2 Efecto del tratamiento enzimático sobre los pétalos de flor del cempoalxochitl.	93
9.6.3 Evaluación de la actividad enzimática residual	94
9.6.4 Efecto del tratamiento enzimático sobre los componentes estructurales de la pared celular de los pétalos de la flor del cempoalxochitl	96
9.6.5 Análisis de cromatografía líquida de alta resolución	99
9.6.5. Conclusiones parciales	101

9.7. Análisis del proceso de lixiviación	102
9.7.1. Lixiviación de xantofilas totales	102
9.7.2. Cinética de extracción de xantofilas	108
9.7.3. Extracción a contracorriente en etapas múltiples	108
9.7.4. Conclusiones parciales	110
X. CONCLUSIONES	111
XI. BIBLIOGRAFÍA	114
XII. APÉNDICES	121
APÉNDICE I	121
APÉNDICE II	129
APÉNDICE III	130
APÉNDICE IV	132
APÉNDICE V	133
APÉNDICE VI	134

II. INTRODUCCIÓN

Por tradición la flor de cempoalxochitl se usa en las festividades del día de muertos, protección de cultivos, fuente de color para pigmentar ropa y algunos alimentos. En la cultura antigua se le emplea para el tratamiento de malestares estomacales (dolor, parásitos intestinales, indigestión, cólicos), infecciones hepáticas, de la vesícula biliar y enfermedades de tipo respiratorio (tos, fiebre, gripe y bronquitis). En México, a nivel industrial, el extracto (oleorresina) saponificado, obtenido del procesamiento de la flor del cempoalxochitl, es ampliamente utilizado en la elaboración de alimentos balanceados debido a sus propiedades pigmentantes. A nivel internacional, la oleorresina se somete a procesos de separación y purificación de sus componentes para ser utilizados en la elaboración de suplementos alimenticios, al ser asociados como compuestos que inhiben el desarrollo de enfermedades degenerativas. Los beneficios asociados al consumo de xantofilas favoreció que reciban el nombre de compuestos nutraceuticos. Como consecuencia, se incremento su demanda ocasionando que alcancen un valor en el mercado internacional que oscila entre 2,500 a 4,000 dólares por libra, dependiendo del tipo de xantofila. Con base a lo anterior, varios trabajos se han realizado con el fin de incrementar la disponibilidad de estos compuestos, que incluye procesos de Síntesis Química y Tecnología de Fermentaciones. Sin embargo, ninguna de las alternativas propuestas ha mejorado los rendimientos que se obtienen de la extracción de la flor del cempoalxochitl, a pesar de que durante su procesamiento se pueden alcanzar pérdidas de hasta el 50% dependiendo de las condiciones de cada etapa del proceso. En general, las operaciones de la extracción comercial consisten en: ensilado, prensado, secado, extracción con hexano y saponificación. De éstas, al ensilado (fermentación espontánea no controlada) se le considera como la operación crítica donde se registran pérdidas que alcanzan hasta el 30%. Etapa que se caracteriza por la depolimerización del material estructural de la pared celular mediada por la actividad de enzimas hidrolíticas con actividad celulolítica principalmente. Con base a lo anterior, se han propuesto tratamientos enzimáticos con celulasas comerciales, como una alternativa para incrementar los rendimientos de la extracción y sustituir la etapa del ensilado. Los resultados de estos estudios muestran aspectos atractivos para que puedan ser considerados como alternativas viables. Quizá, su limitante principal radica en el uso de enzimas comerciales, que pudieran elevar los costos de proceso y limitar su viabilidad económica.

Por ello, considerando la importancia del ensilado en el rendimiento de la extracción de xantofilas, en el presente trabajo se estudió el ensilado considerando los componentes esenciales que integran el proceso global. En éste, se incluyó la selección de los microorganismos saprofitos responsables de la fermentación natural, la relación inóculo-sustrato y el análisis de las condiciones fisicoquímicas específicas asociadas al sistema de fermentación. Variables que permitieron optimizar el rendimiento del proceso y cuyos resultados lo muestran como una alternativa viable a implementar dentro del procesamiento comercial. Además, el conocimiento generado de la caracterización de ésta etapa de proceso, permitió considerar nuevas alternativas para el tratamiento de la flor del cempoalxochitl basadas en el uso del extracto enzimático que sintetizan algunos de los microorganismos saprofitos. Claramente, el tratamiento enzimático descrito presenta ventajas significativas cuando se compara con estudios similares. Los resultados presentados de ésta investigación muestran alternativas viables para el procesamiento de la flor del cempoalxochitl que pudieran contribuir al desarrollo industrial, mejorar el aprovechamiento de los recursos naturales y abastecer la demanda de pigmentos en calidad y cantidad.

III. JUSTIFICACIÓN

Ubicado en el cuarto lugar de biodiversidad, México es origen de plantas de importancia industrial. Dentro de estas se encuentra la flor de cempoalxochitl que es apreciada por su alto contenido de xantofilas, pigmentos utilizados ampliamente en la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética, con una demanda que ha ido en aumento de manera constante. En México, desde 1963 se comenzó a deshidratar la flor de cempoalxochitl y se convirtió en fuente de innumerables investigaciones y diversos usos industriales por lo que su cultivo prometía convertirse en una actividad de elevada rentabilidad. Bajo este contexto el suministro de flor a la industria se hacía a través de contratos con los agricultores donde se especificaba la época de siembra, las cantidades que serían adquiridas, los precios que se pagarían, los sitios de entrega, la calidad del insumo, la supervisión, la vigilancia y las tasas de interés por mora. Para asegurar el suministro y controlar la calidad de la flor, las empresas suministraban la semilla y daban asistencia técnica, manteniéndose en niveles altos la siembra de este cultivo (Figura i).

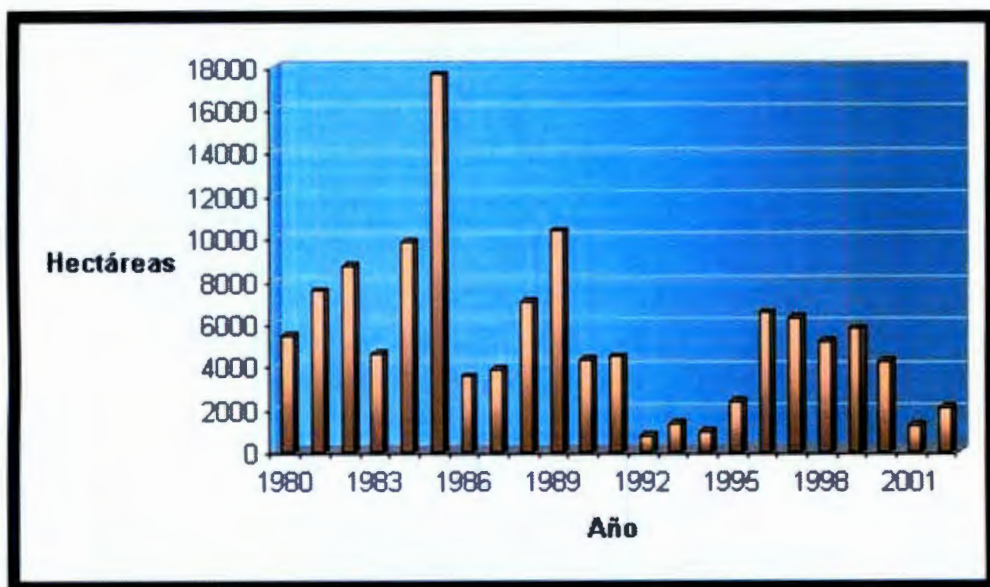


Figura i. Hectáreas sembradas y cosechadas de flor del cempoalxochitl en México. Fuente: SIEA, con datos del Sistema de Información Agropecuaria de Consulta, SAGARPA 2002.

Sin embargo, el limitado avance tecnológico asociado a la carencia de estudios relacionados con la optimización y desarrollo de alternativas de proceso, aunado al rezago en el sector agrícola favoreció, entre otras causas, que se revirtiera el origen del insumo de flor en la industria. Como resultado se disminuyó la actividad agrícola de este cultivo, llegando a niveles críticos a mediados de la década de los noventa (Figura i). En los últimos años, la mayor parte de la flor cosechada se comercializa para fines ornamentales y sólo una pequeña parte, producida en el estado de Sinaloa, se destina a proceso (Figura ii). Más aún, se estima que el 50 por ciento de los viveros en que se siembra el cempoalxochitl producen la flor con semillas o plántulas estadounidenses.

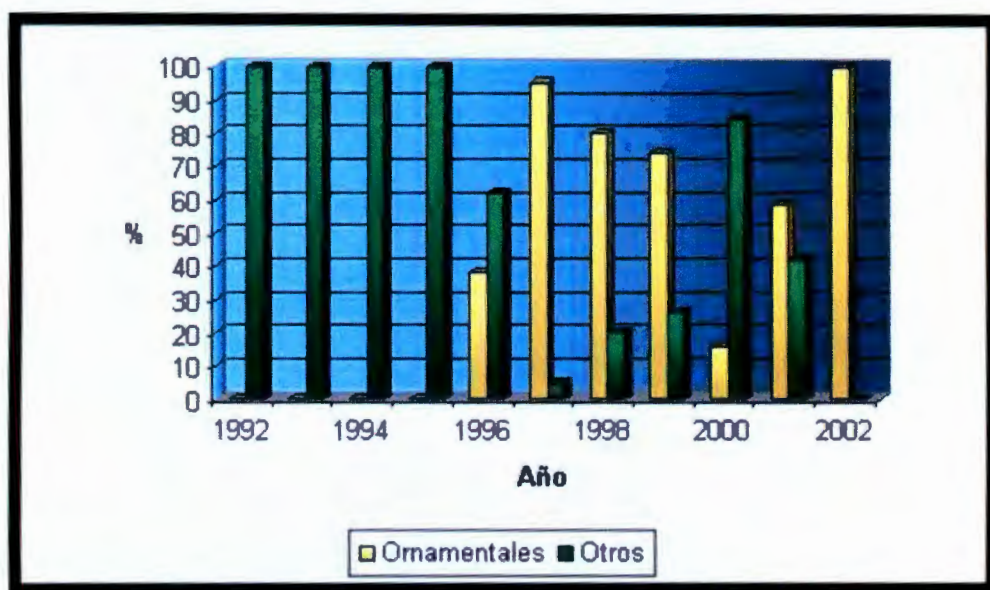


Figura ii. Uso de la producción nacional de flor de cempoalxochitl. Fuente: SIEA, con datos del Sistema de Información Agropecuaria de Consulta, SAGARPA 2002.

Actualmente la mayor cantidad de flor utilizada como insumo de las empresas dedicadas a la obtención de pigmentos de la flor de cempoalxochitl se importa como harina de flor del Perú y China. Comunicaciones personales del sector privado establecen que las causas que originaron esta situación se dieron en el momento de la conjunción en un mismo problema de los bajos rendimientos de flor cosechada y la calidad poco satisfactoria de la harina de flor obtenida por los métodos del ensilado tradicional (8-10 g de xantofilas por Kg de harina). Aunado a ello, se asocian los costos de producción donde se calcula que el

gramo de harina obtenida por los métodos tradicionales cuesta 12 centavos de dólar en promedio, mientras que la harina importada que contiene en promedio 12 gramos de xantofilas por kilogramo de harina, cuesta 15 centavos de dólar. El precio, la calidad y los requerimientos para la obtención de harina de flor originaron una disminución en la actividad industrial con el cierre de las deshidratadoras que producían harina de flor de cempoalxochitl. En la actualidad, gran parte de la importación de materia prima para la industria ya no sólo la representa la harina, también se incluye el producto de la extracción (oleorresina), que va en aumento de manera significativa. Si esta tendencia continúa, en un futuro cercano también se cerrarán las áreas industriales dedicadas a la extracción de xantofilas de harina de flor. En general, este comportamiento negativo ha originado el cierre de industrias o una disminución de hasta un 50% de su actividad. Actualmente, en México no existe ninguna organización registrada que se dedique al cultivo del cempoalxochitl para uso industrial, la última registrada fue Bioquimex, que se trasladó a China, en donde puede trabajar con esquemas como el de agricultura por contrato, mano de obra barata y recibe estímulos fiscales.

Si bien es cierto que la invasión de productos de China representa un problema para los productores a nivel mundial, también es cierto que su supervivencia depende, en gran medida, de su capacidad para alcanzar niveles satisfactorios de calidad, así como para entender los cambios reflejados en la nueva conformación de competidores y proveedores en el ámbito mundial. En otras palabras, se tendrán que explotar sus ventajas comparativas al máximo, de manera tal que aquellas empresas que sean incapaces de competir en costos contra productos de China, tendrán que encontrar mercados que requieran calidad por encima del precio, que idealmente significa la necesidad de desarrollar procesos eficientes empleando recursos mínimos. De otra manera, la flor de cempoalxochitl, arraigada a nuestra cultura desde la época prehispánica dejará de ser, si es que aun lo es, exclusivamente mexicana y, de no cambiar la situación actual, pronto se tendrá que importar en su totalidad. Su atractivo comercial, asociado a sus compuestos pigmentantes, seguirá abriéndose paso en diversos sectores industriales, pero México habrá quedado, una vez más, fuera de la competencia.

Con base a lo anterior, en este trabajo se estudió el proceso de ensilado de la flor de cempoalxochitl y se analizaron las variables de proceso que permitieron caracterizar las operaciones con más pérdidas en este proceso agroindustrial. Con los resultados obtenidos podrán plantearse las bases que permitan el desarrollo de un proceso viable para incrementar la calidad de las harinas de la flor de cempoalxochitl y contribuir de esta manera al desarrollo industrial.

IV. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

México posee una de las vegetaciones más ricas y variadas de la Tierra, se ubica en el cuarto lugar mundial en biodiversidad al contar con casi todos los tipos de climas y suelos descritos a lo largo del planeta. En su superficie se encuentra el 10% de la flora mundial y se le ha señalado como centro de origen y diversidad de plantas cultivadas que han adquirido gran importancia en todo el mundo.

Con base al Inventario Nacional Forestal Periódico realizado por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (1994), el 15.6% de la superficie forestal del país (estimada en 1 417 451.6 km²) son áreas perturbadas donde ya no existe vegetación original. El 11.7% de los bosques y el 25.6% de las selvas están fragmentadas con vegetación original remanente menor al 40%. Aunado a ello, la marginación (Huautlí o alegría, *Amaranthus hybridus*, vetada por la Inquisición al emplearse como alimento en las fiestas de los aztecas), el olvido (*Vigna sinensis* fue olvidada, al parecer por *Phaseolus vulgaris*), el empleo de semillas mejoradas y la sustitución de cultivos, han originado que los cultivos autóctonos se encuentren en peligro de extinción y por ende la pérdida de la variabilidad genética. En general los cultivos autóctonos evolucionan de manera natural, adquiriendo características especiales únicas e inigualables a diferentes condiciones ambientales y sistemas de producción. Se han encontrado variedades para cualquier necesidad específica: variedades con diferentes grados de tolerancia al calor, frío o sequía, adaptación a diferentes tipos de suelo, altitud y latitud, resistencia a pudriciones radicales (por ejemplo, plantas con alto grado de resistencia a los gorgojos brúquidos, *Zabrotes subfasciatus* y *Acanthoscelides obtectus*, que causan pérdidas en almacenamiento calculadas en 13-15%), elevada calidad nutritiva y de composición.

Dentro de este grupo autóctono, se encuentran: el maíz o teocintle (*Zea spp*), Frijol, (*Phaseolus spp*), chile (*Capsicum spp*), calabaza (*Cucúrbita spp*), jitomate (*Lycopersicon spp*), tomate de cáscara (*Physalis philadelphica Lam.*), amaranto (*Amaranthus spp*), Girasol (*Helianthus spp*), jojoba (*Simmondsia chinensis Link*), chía (*Salvia spp*), vainilla (*Vanilla planifolia*), chocolate (*Theobroma cacao*), agave (*Tequilana weber*), chicozapote (*Manilkara zapota L.*), henequén (*Agave fourcroides Lem.*), ixtle (*Agave saliana Otto.*), sisal (*Agave sisalana Perrine*), algodon (*Gossypium hirsutum L*), **cempoalxochitl** (*Tagetes*

spp), plantas medicinales (3,352 especies distribuidas en 1,214 géneros y 166 familias de plantas vasculares que implican sólo un tercio), gramíneas (se registran 133 géneros con 564 especies) y ornamentales (México es tan rico en este tipo de especies que no ha podido ser cuantificable en número de especies) (Gómez-Pompa, 1998).

4.1. Cempoalxochitl.

Este vocablo fue usado en la época prehispánica para designar una serie de plantas de olor con inflorescencias amarillas y anaranjadas usadas en ceremonias religiosas. El cempoalxochitl es una planta herbácea anual de 50 a 100 cm de altura, muy ramificada. Las hojas presentan nervaduras con los bordes dentados y sus flores circulares son de color amarillo-naranja. Tiene su origen en México y habita en climas cálido, semicálido, seco y templado. Crece en huertos y en terrenos de cultivo, está asociada a distintos tipos de selva tropical caducifolia, subcaducifolia, bosques espinosos, mesófilo de montaña, de encino y pino. Esta es una especie de antiguo y extendido empleo medicinal en gran parte de nuestro país, donde se recomienda para dolor de estómago, parásitos intestinales, *empacho*, diarrea, cólicos, afecciones hepáticas, bilis, vómito, indigestión, dolor de muelas, lavados intestinales, tos, fiebre, gripe, bronquitis y para expulsar gases. El tratamiento consiste en el cocimiento de las ramas, con o sin flores, en sahumero o fritas para aplicar de manera oral o en la parte afectada; otras formas de uso son en baños, untada, en fomentos o inhalada, a veces mezclada con otras plantas. En el campo agrícola los cultivos de cempoalxochitl han sido empleados como nematocida e insecticida. Se han descrito 55 especies del género *Tagetes* en México de las cuales *T. erecta*, *T. patula*, *T. tenuifolia* y *T. jalisciensis* se agrupan como cempoalxochitl; las dos primeras cultivadas y las otras silvestres. El cempoalxochitl se encuentra en los estados de San Luis Potosí, Chiapas, Estado de México, Puebla, Sinaloa, Tlaxcala y Veracruz. Dependiendo de la región de cultivo se le han asignado distintos nombres dentro de los cuales se pueden citar: apátsicua, cempaxúchil, cempazúchil, cempoalxochitl, cempusóchil, zempoalxóchitl, cempoal, cempoalxóchil, cimpual, flor de muerto y marigold. El término común "marigold" abarca una diversidad de plantas con flores doradas que incluye las especies de *Tagetes* de América (Martinez, 1979; Mendieta y Del-Amo., 1981; Rzedowski, 1985).

4.2. Usos y aplicaciones.

El cultivo de variedades de *Tagetes* se ha distribuido a lo largo del planeta para diversos propósitos dentro de los cuales se pueden citar: decorativos y/o ornamentales, empleo en ceremonias religiosas, protección de cultivos contra plagas, como colorante e industrial para la extracción de **xantofilas** (compuestos pigmentantes usados para la elaboración de alimentos balanceados para el área avicultura y piscicultura, elaboración de cosméticos, medicamentos y alimentos fortificados).

4.3. Xantofilas

Son pigmentos amarillos típicos de las hojas de los vegetales. Estos son derivados oxigenados de los carotenoides, tetraterpenos de 40 carbonos, simétricos y lineales, formados a partir de ocho unidades de isoprenoides de cinco carbonos arreglados de manera que su ordenamiento se invierte en el centro de la molécula. Derivados biosintéticamente a partir del acetil CoA para formar isopentil pirofosfato (IPP) a través de la ruta del ácido mevalónico. O bien, a partir del gliceraldehido-3-fosfato y piruvato, usados como sustratos para formar dimetil alil pirofosfato (DMAPP) por una serie de reacciones conocida como camino alternativo del IPP (Figura 4.1), el DMAPP es convertido a IPP. El IPP es convertido a geranyl geranyl pirofosfato (GGPP) a través de una reacción de isomerización catalizada por la IPP isomerasa seguida de una serie de reacciones de condensación por GGPP sintetasa (Figura 4.1). El GGPP es dimerizado por fitoeno sintetasa para formar fitoeno, el primer tetraterpeno de 40 carbonos. El fitoeno es convertido a licopeno, primer pigmento carotenoides, a través de una serie de reacciones de deshidrogenación catalizada por una o más desaturasas (Figura 4.2). El licopeno puede servir como un precursor de una variedad de otros pigmentos carotenoides. El licopeno puede ser convertido a β -caroteno a través de dos reacciones secuenciales de ciclización catalizadas por β -ciclasa. La β -ciclasa cicliza los extremos terminales de la molécula de licopeno para formar anillos- β (Figura 4.3). El β -caroteno formado puede ser convertido a zeaxantina por dos reacciones de hidroxilación secuencial catalizadas por β -hidroxilasa, la cual adiciona grupos hidroxilo al carbono número 3 de cada anillo- β (Figura 4.3).

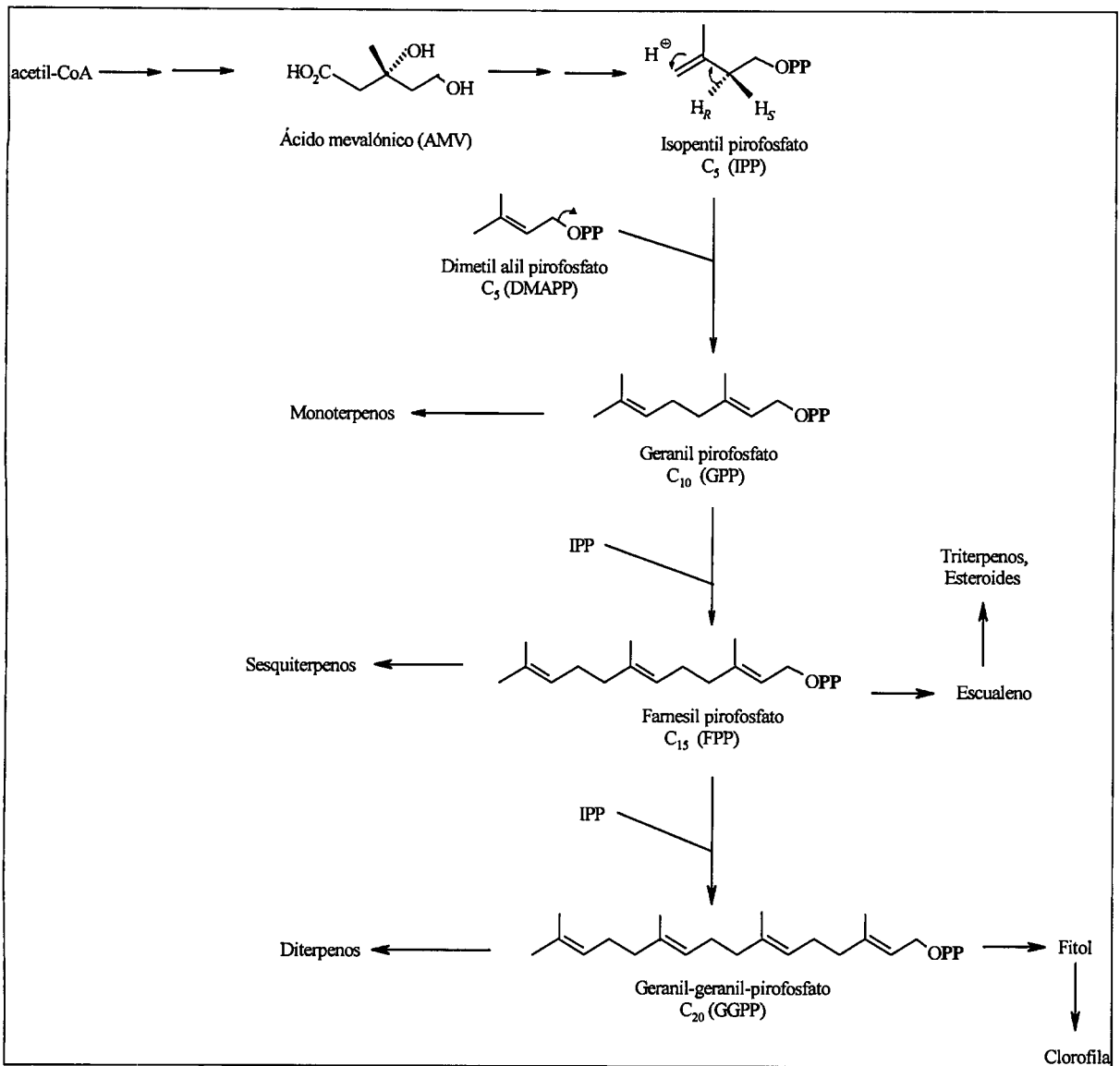


Figura 4.1. Ruta biosintética para la formación de geranil-geranil pirofosfato a partir del isopentil pirofosfato (Adaptado de *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Goodwin, T.W. Academic Press. Londres).

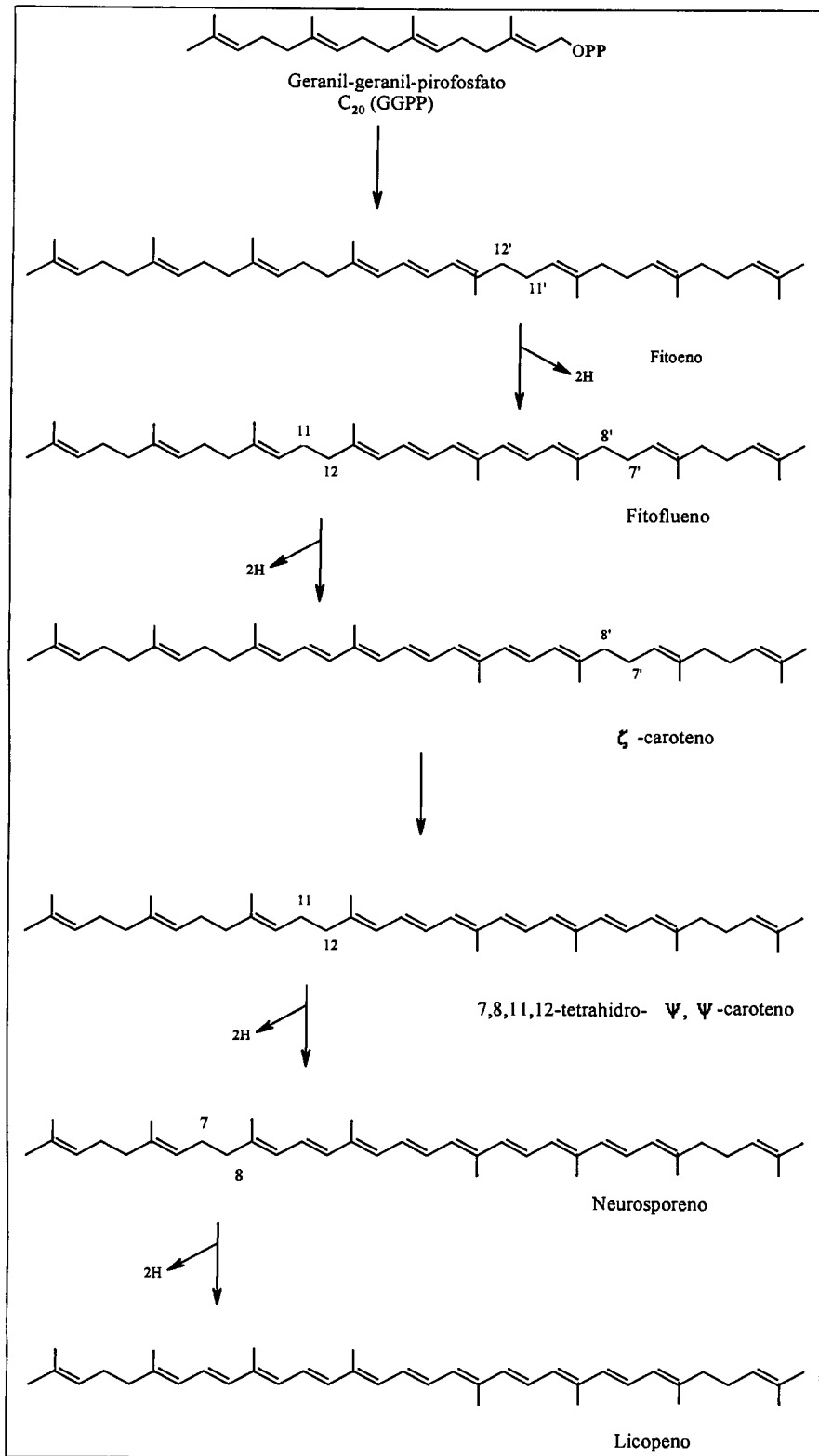


Figura 4.2. Ruta biosintética para la formación de licopeno a partir de geranyl-geranyl pirofosfato (Adaptado de *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin, T.W. Academic Press, Londres).

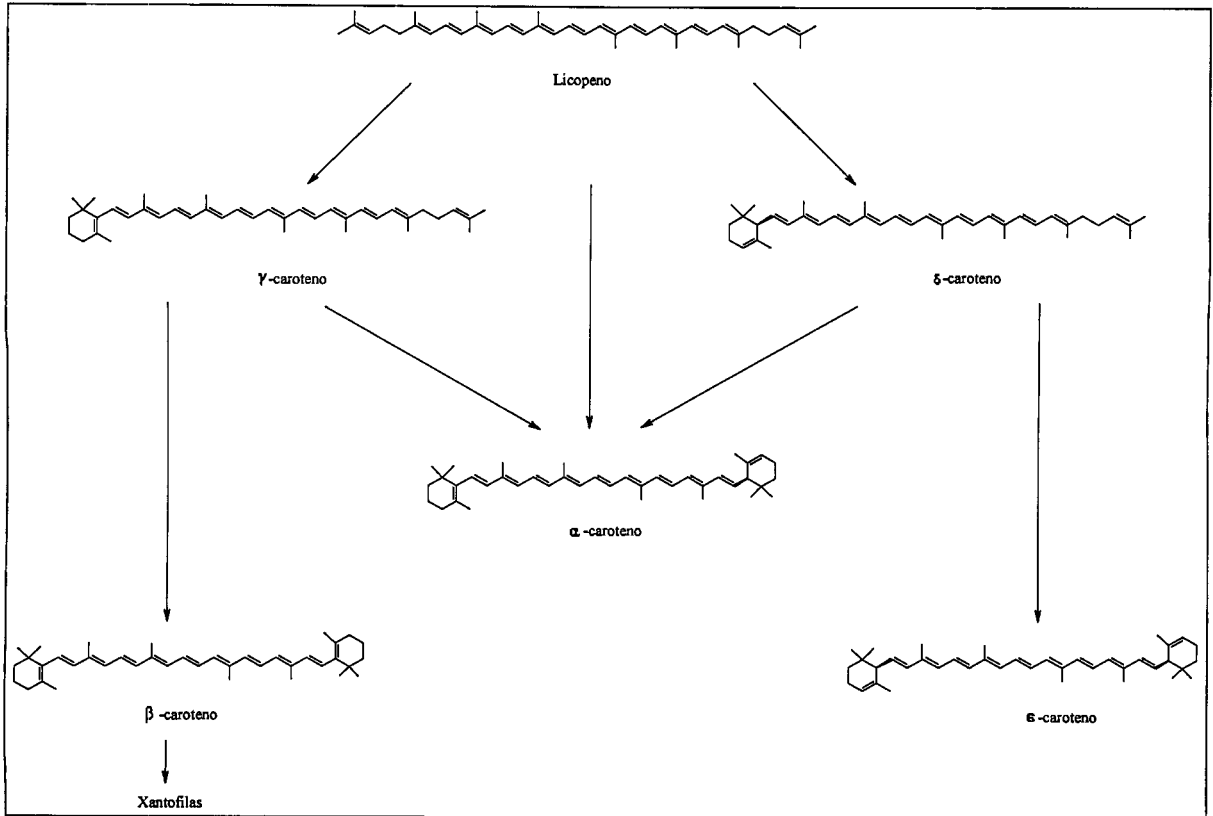


Figura 4.3. Ruta biosintética para la formación de β -caroteno a partir de licopeno (Adaptado de *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin, T.W. Academic Press, Londres).

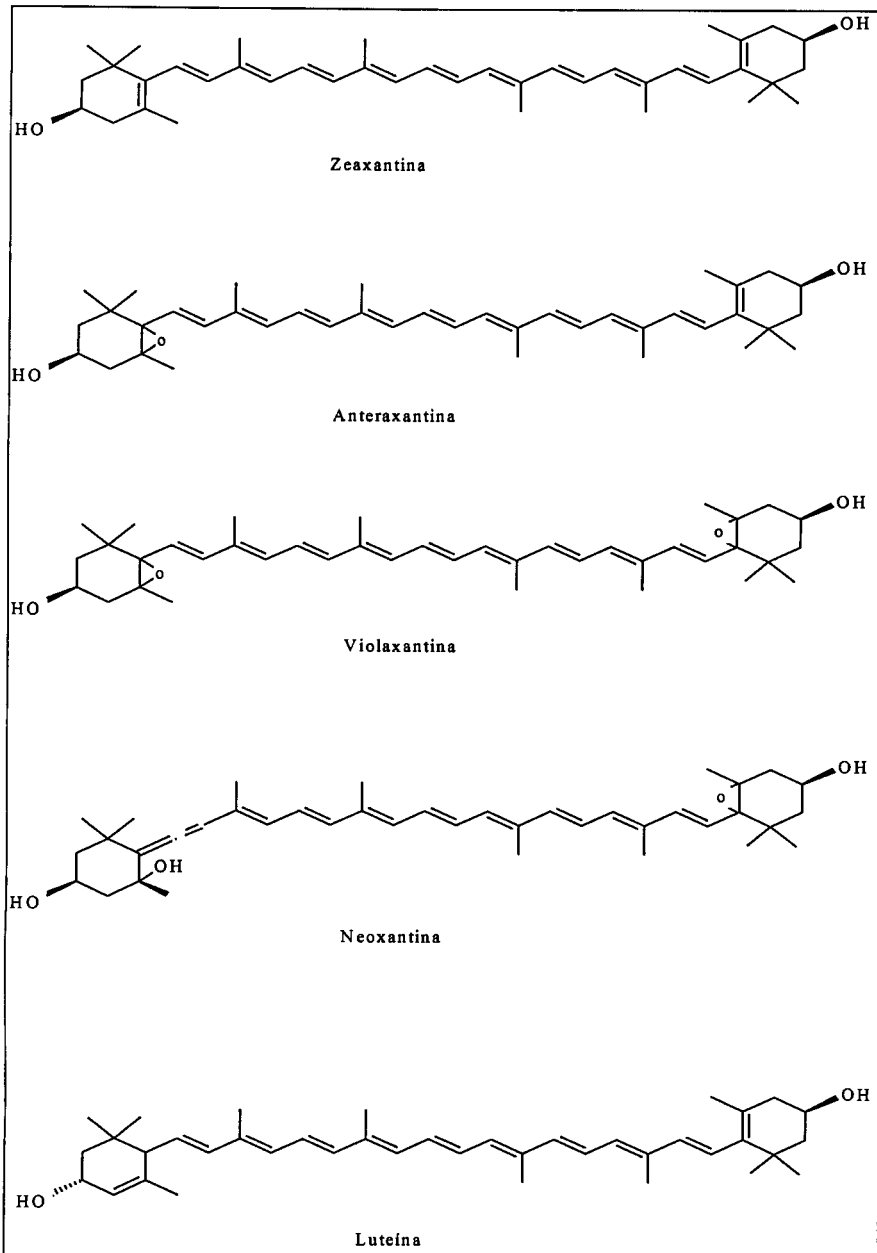


Figura 4.4. Estructuras típicas de oxicarotenoides acumulados en plantas (Adaptado de *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. Goodwin, T.W. Academic Press, Londres).

Los carotenoides son estructuras cíclicas en ambos de sus extremos formando anillos β de seis miembros (a veces denominados β -ionona) o anillos ϵ (algunas veces denominados α -ionona). Así, el β -caroteno, β -criptoxantina, zeaxantina y astaxantina tienen dos anillos β , mientras que el α -caroteno y la luteína tienen cada uno un anillo β y un anillo ϵ (Figuras 4.3 y 4.4). Dos rasgos estructurales establecen la diferencia entre los diferentes oxicarotenoides conocidos. Uno está asociado al esqueleto de dobles enlaces conjugados, el cual consiste en alternar enlaces carbono-carbono simples y dobles. Por lo general se denomina cadena poliénica.

Esta parte de la molécula conocida como el cromóforo, es responsable de la capacidad de absorber la luz en la región visible y en consecuencia, de su gran capacidad de coloración. Se requieren al menos siete enlaces dobles conjugados para que una molécula produzca color. El color se acentúa a medida que se extiende el sistema conjugado, así el licopeno es rojo. La ciclación causa algún impedimento, por tanto el β -caroteno es de color naranja, aunque tiene el mismo número de enlaces dobles conjugados que el licopeno (once). Así, por ejemplo, el número de enlaces conjugados de la zeaxantina es de 11 y el de la luteína es de 10 por ello, la capacidad pigmentante de la zeaxantina es del doble de la luteína. La otra característica distintiva es la presencia de grupos oxidrilo en los anillos β , ϵ o α ionona. Debido a esto, el espectro de los carotenoides es bastante característico en el rango de 400 a 500 nm. Con un máximo principal alrededor de 450 nm y dos máximos secundarios u hombros a cada lado (Figura 4.5) (Goodwin, 1980).

En general, los carotenoides son sustancias hidrofóbicas, lipofílicas y son virtualmente insolubles en agua. Se disuelven en solventes polares como acetona, alcohol, éter etílico, tetrahidrofurano y cloroformo. Específicamente, los carotenos son fácilmente solubles en éter de petróleo y hexano. Por otro lado, las xantofilas se disuelven mejor en metanol y etanol por sus características hidrofílicas. En estos compuestos, uno o ambos anillos de ionona están hidroxilados, lo que hace posible la esterificación con un ácido graso (Goodwin, 1980).

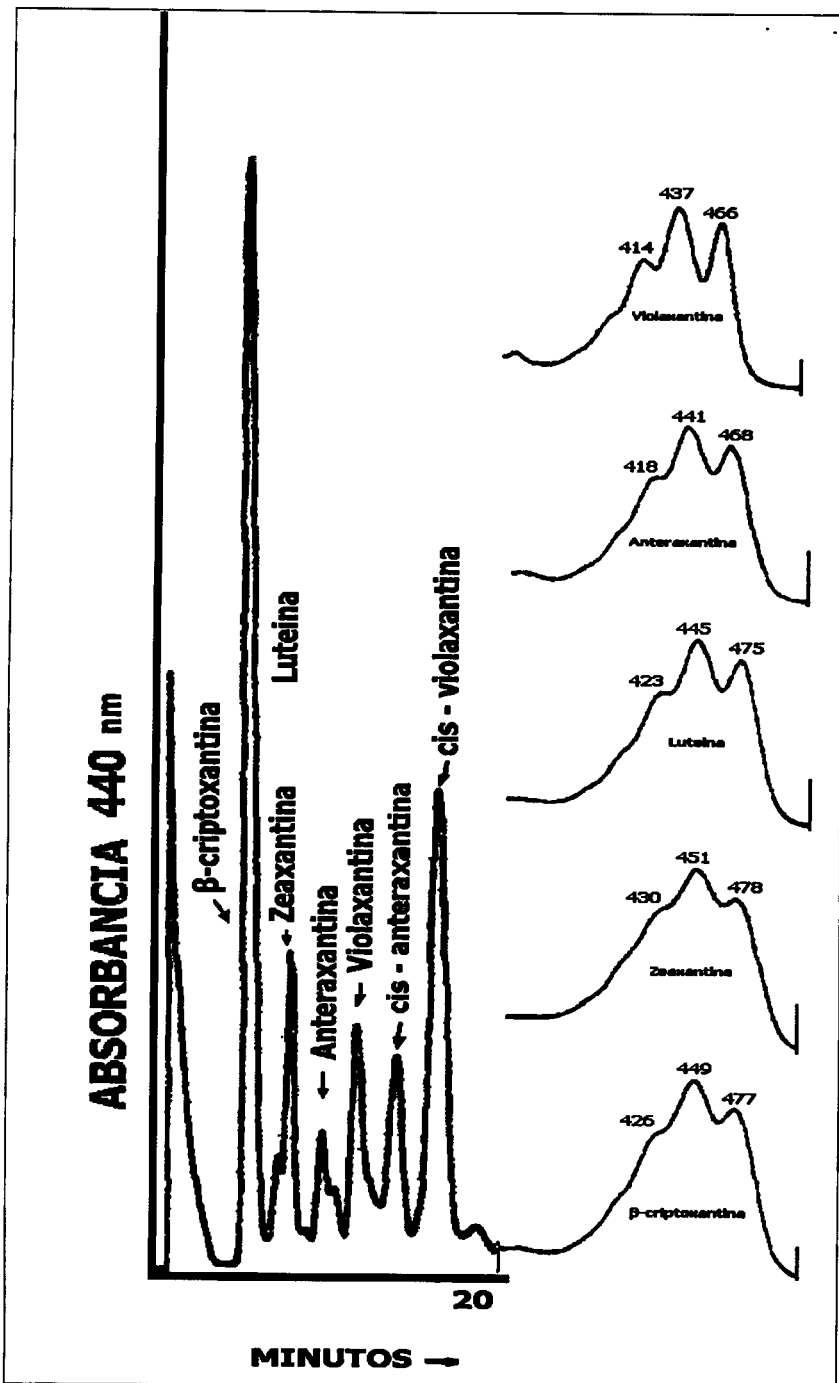


Figura 4.5. Espectros de cromatografía de líquidos de alta resolución y espectrofotometría de los perfiles de algunos oxi-carotenos (Stewart, 1977).

4.3.1. Comercio internacional.

Tagetes glandulifera y *Tagetes minuta*, especies de *Tagetes*, son cultivadas preferentemente en África del sur, la India, y en menor escala en América del Sur para la producción de "Tagetes oil", un aceite esencial empleado en la industria de la perfumería internacional con una demanda mundial de aproximadamente 10 toneladas anuales. Por otro lado, extractos totales y fracciones (con diferentes solventes) de hojas de *Tagetes minuta* muestran diferentes grados de actividad antimicrobiana sobre el desarrollo de bacterias Gram positivas y Gram negativas, actividad relacionada a la presencia de varios tipos de isoflavonoides predominando la quercetagetin-7-arabinosil-galactosidasa (Terescchuk y col. 1997).

Tagetes erecta o marigold azteca (flor de cempoalxochitl) se cultiva principalmente para ser usada en la formulación de alimentos balanceados para la avicultura y piscicultura. El objetivo es conseguir una coloración más intensa en la yema del huevo, en la grasa subcutánea y piel de los pollos, y en el músculo y la grasa subcutánea de los salmónidos (trucha y salmón).

La década de los años noventa vino a dar un giro importante en el uso de xantofilas, principalmente luteína y zeaxantina, al mostrar en 1993 la revista *Vitamin Research Products Newsletter* evidencias de la importancia nutricional de las xantofilas. A partir de ello una serie de investigaciones se han realizado encontrando que las xantofilas (luteína y zeaxantina) actúan como antioxidantes, mejoran la respuesta inmune de las persona, previenen el cáncer y la degeneración macular relacionada con la edad con lo que se puede mejorar la calidad de vida de los pacientes (Seddon y col. 1994; Hari y col. 1994; Yin y Subczynsky, 1996; Fullmer y Shao, 2001). Fullmer y Shao (2001) clasificaron a la luteína como antioxidante único entre la familia de los carotenoides. Se le considera selectivo y específico de actuar y depositarse en los tejidos del ojo, sugiriendo que está relacionado con el mantenimiento de la salud visual al incrementar la pigmentación de la mácula que actúa como filtro y que es el tejido responsable de la función visual central y agudeza.

Los grandes beneficios que traen al sector salud han ocasionado que a ciertos alimentos y bebidas les sean adicionados luteína y zeaxantina para incrementar su consumo diario una vez que han alcanzado el estatus de compuestos GRAS de acuerdo a la sección 201 del Acta de Alimentos, medicamentos y Cosméticos (FDCA, por sus siglas en inglés) y

al Código Federal de Regulación (sección 170.3-b) de los Estados Unidos de América y de la Comisión de Regulación para la autorización de nuevos aditivos (EC, No. 2316/98; diario oficial) de la Comunidad Europea.

Actualmente se ha propuesto el uso de luteína cristalina purificada para la adición directa en barras de granola, barras energéticas, bebidas energéticas, bebidas de frutas, jugos de frutas, jugos vegetales mixtos, cereales y leche de soya. Los estudios de los productos alimenticios fortificados no han mostrado alterar el sabor, olor o textura. Algunos efectos sobre el color se han presentado en bebidas que originalmente son claras (Fullmer y Shao, 2001).

4.3.2. Demanda mundial y tendencias de suministro de harina y oleorresina de flor del cempoalxochitl.

Hasta principios de la década de los años noventa, la harina de flor de cempoalxochitl era producida principalmente en México, Perú, Ecuador, Argentina y Venezuela. En menor escala se incluían China y la India además de Sudáfrica y Zambia. No se sabe a ciencia cierta cómo fué y en qué momento estas tendencias sufrieron cambios, a tal grado, que en la actualidad los principales productores de harina de flor de cempoalxochitl son China, la India y el Perú.

A excepción del Perú, las estadísticas en producción y comercio internacional de harina y oleorresina de flor del cempoalxochitl es escaso e inestable. Sin embargo, se estima que el comercio mundial total es equivalente a varios miles de toneladas de harina anualmente. Las exportaciones peruanas eran exclusivamente de 3,000 toneladas de harina a final de los años ochenta. En la década de los años noventa, el Perú incrementó en 45.4% las agroexportaciones en el periodo de 1994 a 1999, pasando de US \$ 493.78 millones a US \$718.06 millones. Destacándose las exportaciones de café, hortalizas, legumbres y frutas frescas y preparadas, harina de marigold, colorantes naturales que incluye extractos de harina de marigold, cacao y cochinilla. En específico, las exportaciones de harina de flor de marigold y extractos de harina de marigold (xantofilas) han contribuido con un incremento de 4.9%, con una variación de 39.1% para harina de flor y de 2127.3% para los extractos. Entre los principales mercados se encuentran: México, Estados Unidos, España, Francia y Japón (Promex, 2000).

En la propia América Latina, existe un comercio grande de los productos obtenidos de la flor de cempoalxochitl donde son extensamente empleados en alimento avícola. México, en la década de los años ochenta, a pesar de ser uno de los países con mayor producción de harina de flor de cempoalxochitl, importaba cantidades sustanciales para abastecer las necesidades de su industria de extracción. En la actualidad los incrementos en la importación de harina de flor de cempoalxochitl oscilan alrededor del 90% tal y como lo muestran las tendencias evolutivas de cultivo de flor en territorio mexicano. Estudios publicados por la SAGAR (2000) muestran que a principios de los años noventa el número de hectáreas sembradas de flor de cempoalxochitl oscilaba entre 12,000 y 15,000 en todo el territorio nacional. Para 1998 el número de hectáreas sembradas disminuyó a 8,726. Actualmente sólo un grupo de ejidatarios del estado de Sinaloa siembran y cultivan flor del cempoalxochitl destinada al procesamiento industrial para la obtención de sus agentes pigmentantes cuyo número de hectáreas oscila entre los 3,500 a 4,000.

Con relación a los extractos de harina (oleorresina), en los años ochenta, México era considerado como el productor principal del extracto de harina de flor del cempoalxochitl, en segundo lugar se ubicaba Perú con una producción de menor escala comparada con la producida en México. Actualmente Perú es el principal productor de oleorresina en América Latina e importa cantidades sustanciales a México.

Independiente al origen de la materia prima (harina u oleorresina), en México, la mayor cantidad (aproximadamente el 90%) de extractos de xantofilas a partir de flor del cempoalxochitl son empleados en la formulación de alimentos balanceados para pollos y el resto como aditivos en la elaboración de alimentos para consumo humano.

A nivel internacional, los extractos son usados de manera similar a México. En Europa Occidental se estimó que los extractos usados como aditivos para la elaboración de alimentos destinados al consumo humano fueron del orden de una tonelada por año. Una situación similar fue observada en los Estados Unidos. Así mismo, se pronosticaba que el incremento de aplicación en los países desarrollados dependería de las tendencias en legislación y, específicamente, un requisito para pruebas toxicológicas costosas antes de ser aceptado como un colorante natural. También, la competitividad de calidad/precio de flor del cempoalxochitl con otras fuentes naturales sería un factor significativo en el uso futuro (Henry, 1992; Marmion, 1984).

Con base a lo anterior, Taylor (1996) estimó que a nivel mundial las ventas de estos pigmentos oscilaban entre 100 y 150 millones de dólares anuales con incrementos aproximados del 10% tan solo para el mercado de los alimentos balanceados. El impacto en el sector salud y certificación de compuestos GRAS, ha incrementado la demanda de éstos agentes pigmentantes, ocasionando que alcancen un valor en el mercado internacional que oscila entre 2,500 y 4,000 dólares por libra dependiendo del tipo de xantofila.

Bajo estas consideraciones los departamentos de investigación del sector productivo y científico se han enfocado a la tarea de incrementar la disponibilidad de xantofilas basados en tres líneas bien definidas: 1) búsqueda y desarrollo de alternativas viables para la producción de xantofilas, 2) desarrollo de nuevos métodos de obtención a partir de fuentes naturales y 3) optimización de los métodos tradicionales de producción industrial. Como resultado han aparecido un gran número de publicaciones técnico-científicas y un incremento considerable en el número de patentes internacionales que hasta 1996 era de 38, actualmente se encuentran registradas mas de 200 (United States Patent and Trademark Office).

4.4. Alternativas viables de producción.

Una gran cantidad de estudios se han desarrollado con la finalidad de incrementar la producción y por ende la disponibilidad de xantofilas en breves periodos de tiempo y relativamente a bajo costo. Con base a lo anterior, se han estudiado diferentes estrategias, correspondientes a los métodos de síntesis conocidos, dentro de las cuales se pueden citar: la Síntesis Química y la Tecnología de Fermentaciones usando microorganismos silvestres y modificados genéticamente (Ausich, 1997).

4.4.1. Síntesis Química.

Por tradición, esta es el área de la ciencia donde la mayor cantidad de productos se ha desarrollado. Actualmente, su empleo se ha limitado a la síntesis de productos no destinados directamente al ser humano, pues si bien algunos productos no son tóxicos, como tales, a ciertas dosis los reactantes residuales o los productos secundarios de la reacción que no son eliminados limitan su empleo. A pesar de ello, Kreienbuhl y col. (2000) desarrollaron un proceso de síntesis química para la producción de carotenoides y

oxicarotenoides, el cual involucra una reacción de Wittig, la cual en términos generales permite obtener una olefina a partir de un aldehído y una sal de fosonio (Figura 4.6).

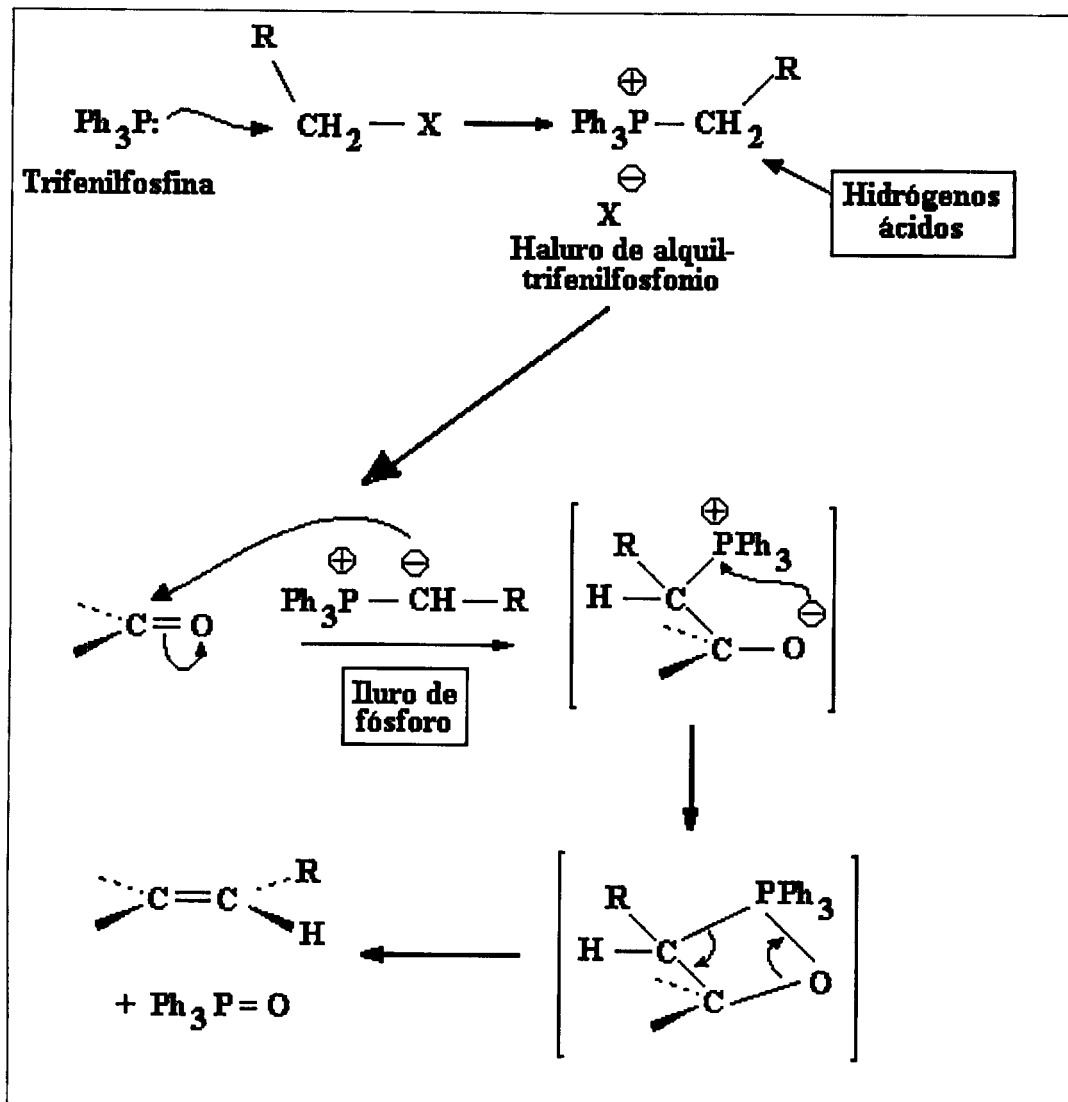


Figura 4.6. Reacción de Wittig para la síntesis Química de carotenoides (Kreienbuhl y col. 2000).

Esta reacción se lleva a cabo en un medio polar de manera que los reactivos y los carotenoides que se forman no se disuelven significativamente en el medio de reacción. El proceso descrito permite el uso de mezclas de reacción mucho más concentradas, simplifica la regeneración del solvente, la reacción en general y evita solventes que son tóxicos, como los solventes halogenados. El proceso ha sido desarrollado para industrias Hoffmann-La Roche (Roche Vitamins Inc.). Aún cuando se reportan ciertas ventajas de este proceso, todavía es impráctico ya que la reacción requiere de mucho tiempo para completarse, implica demasiadas etapas para la separación y purificación de los productos y por ende aún no se logra un óptimo económico para la producción de xantofilas a nivel industrial.

4.4.2. Tecnología de Fermentaciones.

Considerada como el área principal para la manufactura de cualquier tipo de compuestos, la tecnología de fermentaciones ha sido utilizada exitosamente para la producción de oxicarotenoides (zeaxantina, astaxantina, luteína, cantaxantina y criptoxantina).

La zeaxantina es biológicamente sintetizada por algunas especies de bacterias del género *Flavobacterium*. Gierhart, (1995) describe un proceso fermentativo para la producción de zeaxantina utilizando *Flavobacterium multivorum*, en un fermentador agitado que opera a 400 RPM, 30° C, pH del medio (extracto de levadura: 0.1%, cloruro de sodio: 0.5%, sulfato de magnesio: 0.1%, licor de maíz: 8.0%, harina de licor de maíz: 5.0%, aceite vegetal: 1.0%, acetato de sodio: 0.1%, sulfato de amonio: 0.5%, sulfato de hierro: 0.001%, tiamina: 0.1%, lipasa: 0.05%, glucoamilasa: 0.05%, amilasa: 0.05%) ajustado a 7.2-7.5, velocidad de burbujeo de 0.25 VVM aproximadamente para mantener un nivel de oxígeno disuelto de 50% de saturación e inoculado a un nivel del 5% (v/v) de biomasa. Bajo estas condiciones, a las 36 horas de fermentación el rendimiento celular fue de 13 g/l con 11 µg/ml de zeaxantina. El producto obtenido presenta del 95-99% de zeaxantina, comprobada al realizar el análisis comparativo a la zeaxantina aislada de maíz. El proceso descrito permite obtener mayores cantidades de zeaxantina y células que la contienen comparado con otros procesos de fermentación desarrollados.

La astaxantina ha podido ser producida vía fermentaciones usando diferentes microorganismos de *Haematococcus pluviallis* (Zhang y col. 1999), *Chlorococcum sp* (Ma

y Chen, 2001) y cepas silvestres de *Phaffia* (Ho y col. 1999; Jacobson y col. 2000). *Phaffia* es conocida como el microorganismo que produce astaxantina en exceso usando técnicas de fermentación sumergida cuando se extiende la fase de producción en la fermentación por una o varias técnicas que incluyen exposición del microorganismo a intensidades bajas de luz, fermentación por lote alimentado, y/o fermentación continua. La habilidad de este microorganismo para producir astaxantina se pone de manifiesto al ser objeto de cuatro patentes internacionales durante el año de 1999 (US Patent and Trademark Office; Vázquez y Martin, 1998; Jacobson y col. 2000). Con base en lo anterior, los procesos de fermentación usando este microorganismo han recibido gran atención industrial como fuente natural de astaxantina. Sin embargo, ninguno de estos procesos desarrollados han logrado eficientar la producción de astaxantina lo suficiente como para competir con los productos obtenidos por síntesis química (astaxantina sintética).

El desarrollo de una mutante de *Phaffia* (*P. rhodozyma*) encontrada en la naturaleza ha permitido producir altos niveles de astaxantina. *Phaffia rhodozyma* es un microorganismo estable con capacidad de producir cantidades mayores de 3,000 ppm de astaxantina en base seca de sólidos de levadura, aún cuando es cultivada en altos volúmenes de medios nutritivos (ejemplo 1,500 l o más) (Jacobson y col. 2002).

Paracoccus marcusii es una especie bacteriana novedosa con capacidad de sintetizar varios tipos de xantofilas (zeaxantina, astaxantina, luteína, cantaxantina y criptoxantina). El proceso de producción comprende el desarrollo en un medio nutritivo que contiene fuente de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, etc.), fuente de nitrógeno (nitrato de potasio, amonio, urea, etc.), sustancias inorgánicas (sulfato de magnesio, sulfato férrico, fosfato ácido de potasio, etc.) y otros nutrientes (vitaminas, peptona, extracto de levadura, etc.). El pH se ajusta a básico ligero, temperatura de 30° C promedio, en condiciones aeróbicas. Los productos obtenidos son aislados y purificados por extracción con solventes orgánicos polares seguida de adsorción (Hirschberg y col. 1999).

La luteína junto con el β -caroteno y la violaxantina han sido virtualmente encontrados en todas las especies de la microalga *Chlorophycean* en cantidades sustanciales y en menor cantidad cantaxantina y astaxantina. Del Campo y col. (2000) muestran que *Muriellopsis sp* produce luteína en cantidad equivalente al reportado para

astaxantina en *Haematococcus*, por lo que es considerada como una alternativa viable para la producción de luteína.

En general, los procesos de fermentación descritos son atractivos por la alta pureza de los productos y la subsiguiente disminución de etapas posteriores para aislamiento y purificación, lo que repercute en la relación costo / calidad de productos y nunca se ve limitada la disponibilidad de los productos. A pesar de estas características y que los productos obtenidos son considerados idóneos e inocuos, aun presentan serias limitantes como son: los requerimientos nutricionales no son satisfechos a partir de medios de cultivo de costo reducido, los productos presentan limitada estabilidad, el proceso fermentativo completo requiere de tiempos relativamente largos y se obtienen rendimiento de productos relativamente bajos (comparado con los otros métodos de producción).

Con base en lo anterior, es evidente que existe un gran interés para desarrollar alternativas de producción, sin embargo ninguno de los métodos propuestos mejora los rendimientos, la relación costo / calidad e inocuidad comparado con los productos obtenidos a partir del tratamiento de fuentes naturales.

4.4.3. Fuentes naturales

Las xantofilas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal siendo responsables de sus coloraciones amarillas y anaranjadas. Se concentran principalmente en partes aéreas de las plantas (especialmente en hojas, tallos y flores), en frutos y semillas. Una gran cantidad de fuentes vegetales han sido objeto de estudios para determinar la fuente principal de xantofilas, los resultados muestran a la flor del cempoalxochitl como el recurso vegetal natural con un contenido de xantofilas más elevado que cualquier otra fuente natural (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Contenido de xantofilas en algunos materiales (Cuca y Pro, 1990).

Material	Xantofilas (mg/kg.)
Flor de cempoalxochitl	6000-10000
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	4000
Harina de <i>Spongiococcum excentricum</i>	2200
Polen	1325
<i>Mucus cerratus</i>	920
Harina de hojas de brócoli	670
Harina de chile rojo africano	440
Harina de alfalfa deshidratada (20% de proteína)	400-550
Harina de alfalfa deshidratada (17% de proteína)	185-350
Harina de gluten de maíz (60% de proteína)	330
Harina de gluten de maíz (41% de proteína)	90-180
Harina de achiote (semilla y cascarilla)	274
Zacate bermuda	265
Extracto saponificado de flor de cempoalxochitl	12000-40000

Independientemente del método de análisis es indudable la necesidad de tener un banco de datos acerca del perfil de componentes presentes en la flor de cempoalxochitl. Uno de los trabajos clásicos en esta área fueron los estudios realizados por Quackenbush y Miller (1972). En el estudio trabajaron con flor de cempoalxochitl procedente de México, Francia y los Estados Unidos; varias muestras fueron analizadas usando tanto flor fresca como flor seca, los resultados obtenidos muestran como principales pigmentos luteína (88%) y zeaxantina (3.6%) para la flor mexicana, el resto corresponde a compuestos carotenoides y oxicarotenoides en cantidades relativamente no significativas (Cuadro 4.2). Las diferencias observadas en el perfil de concentración para cada componente son el resultado de las diferentes variedades y/o estado de desarrollo de los materiales usados en los análisis.

Cuadro 4.2. Porcentaje total de carotenoides reportados para distintas variedades de flor de cempoalxochitl (Quackembush y Miller, 1972).

Carotenoide	Americana		Francesa		Mexicana
	Roja	Amarilla	Roja	Amarilla	
Fitoeno	1.9	2.4	1.9	2.9	3.1
Fitoflueno	2.3	2.6	2.9	1.9	2.0
α -caroteno	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
β -caroteno	0.3	0.5	0.6	0.3	0.3
β -zeacaroteno	0.4	0.5	0.8	0.3	0.2
ζ -caroteno	0.1	-	0.1	-	-
α -criptoxantina	0.7	0.8	0.6	0.1	0.2
Zeinoxantina	-	-	0.4	0.7	0.8
Isocriptoxantina	-	-	0.1	0.1	0.1
β -criptoxantina	0.4	0.5	1.4	0.8	0.4
Luteina	87.3	72.2	85.5	87.3	88.0
Anteraxantina	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1
Zeaxantina	4.0	16.4	4.1	4.0	3.6
Neoxantina	0.2	0.8	0.2	0.1	0.1
Crisantemaxantina	0.3	0.8	0.2	0.2	0.2
Flavoxantina	0.4	1.3	0.3	0.3	0.3
Auroxantina	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

4.4.3.2. Oleorresina de flor de cempoalxochitl de producción nacional

Navarrete y col. (2001) trabajaron con extracto (oleorresina) de *Tagetes erecta* o *marigold azteca* obtenida a través de Industrias Alcosa, S.A. de C.V. La oleorresina fue tratada y analizada por cromatografía de líquidos de alta resolución para establecer el perfil de componentes (Cuadro 4.3). Los cromatogramas fueron analizados y se identificaron las

señales con relación a sus tiempos de retención y la integración de las áreas, comparándolos contra estándares comerciales de referencia (Cuadro 4.3 y Figura 4.7).

Cuadro 4.3. Análisis de HPLC de oleorresina de flor de cempoalxochitl.

Pico	Tiempo (min)	Concentración (%)	Componente
4	1.971	0.3305	α -caroteno
9	3.428	0.8208	β -criptoxantina
17	4.799	0.4332	9-cis luteina
21	5.496	0.405	13-cis luteina
24	6.777	84.6655	Trans-luteina
25	7.524	4.6655	Trans-zeaxantina
27	8.731	2.5375	Tran-luteina-E
30	9.98	1.8968	9-Cis-luteina-E
31	10.151	2.5591	13-Cis-luteina-E
32	10.744	0.9416	Violaxantina
34	11.967	0.3836	Neoxantina
49	14.75	0.3879	No identificable

Estos resultados son comparados favorablemente con aquellos reportados por Quackenbush y Miller (1972). La diferencia observada puede ser atribuida a la variedad y grado de madurez de la flor de cempoalxochitl utilizada, así como al método de cuantificación usado (Valadon y Mummery, 1967; Alam y col. 1968; Gregory y Chen, 1986; Delgado-Vargas y Paredes-Lopez, 1996).

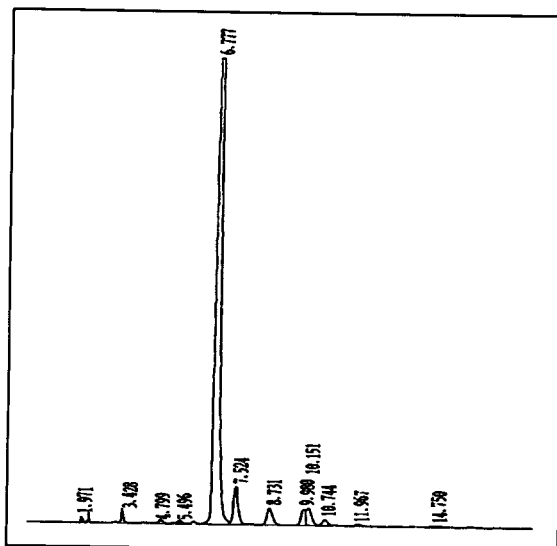


Figura 4.7. Cromatograma de xantofilas lixiviadas de la flor del cempoalxochitl.

Dadas las características de biosíntesis de carotenoides que presenta la flor de cempoalxochitl, se han desarrollado métodos para manipular la ruta biosintética e incrementar la acumulación y tipo de carotenoide usando la tecnología de ADN recombinante.

Hauptmann y col. (1997) patentaron un proceso en el que usaron la tecnología de ADN recombinante para mejorar la acumulación de carotenoides en los órganos de almacenamiento de plantas manipuladas genéticamente introduciendo un vector que contiene un polipéptido quimérico consistente de un gen de la bacteria *Erwinia herbicola* que codifica para fitoeno-sintetasa. Aunque el proceso propone un método para incrementar la producción de fitoeno, el cual es un precursor de carotenoides pigmentantes, no da un método para controlar la proporción de carotenoides específicos en una planta. Esta técnica ha tenido cierto éxito en elevar los rendimientos de ciertos carotenoides en huéspedes bacterianos cuando se les suministra el precursor adecuado; sin embargo, es preferible utilizar especies de plantas superiores en donde los procedimientos de mantenimiento técnico se minimicen y se llegue al óptimo rendimiento de carotenoides específicos. DellaPenna y Cunningham (2001) patentaron un proceso para manipular la proporción de varios carotenoides en plantas con el fin de aumentar la cantidad de los carotenoides

seleccionados. Este proceso involucra plantas transgénicas de flor de cempoalxochitl las cuales producen diferentes proporciones de carotenoides y métodos para producirlos. Según este trabajo, los carotenoides se acumulan en los pétalos de la flor seleccionando una combinación específica de segmentos aislados de ADN que codifican para enzimas que están relacionadas en la biosíntesis de carotenoides para producir ARN, ARN antisentido o sus combinaciones. Este proceso también describe secuencias de ADN aislado que codifican para las enzimas beta-ciclasa, epsilon-ciclasa, beta-hidroxilasa e isopentil pirofosfato isomerasa. Las plantas transgénicas que contienen los genes de flor de cempoalxochitl regulados por un promotor específico de pétalos permite que se incremente la producción de ciertos carotenoides.

A pesar del éxito obtenido con esta tecnología que permite contar con plantas hiperproductoras de pigmentos, se requiere desarrollar y optimizar métodos y/o procesos para aislar y extraer sus agentes pigmentantes con rendimientos significativos empleando recursos mínimos.

4.5. Métodos para la obtención de xantofilas a partir de flor de cempoalxochitl.

Los productos obtenidos del procesamiento de la flor del cempoalxochitl tienen dos presentaciones: 1) material sólido en forma de harina o pellets, y 2) extracto de consistencia líquida y apariencia oleosa (oleorresina). Casos especiales que incluyen etapas de purificación y separación de sus componentes (luteína y zeaxantina) son realizados a la oleorresina durante la saponificación cuando los productos son destinados a la industria farmacéutica, cosmetológica y de alimentos.

4.6. Métodos o alternativas para la obtención de harina de flor de cempoalxochitl.

En general, el proceso de extracción de xantofilas a partir de la flor se puede describir como el retiro de una fracción soluble; la separación implica la disolución selectiva de las xantofilas y la transferencia de masa por mecanismos difusivos. El constituyente soluble está incorporado dentro de la estructura celular de donde es separado mediante diferentes métodos dentro de los cuales sobresalen: extracción con fluidos

supercríticos, tratamientos enzimáticos y extracción con solventes (extracción sólido-líquido o lixiviación).

4.6.1. Extracción con fluidos supercríticos.

En los últimos veinte años, la extracción con fluidos supercríticos ha sido considerada como lo más cercano a la operación ideal de algunas etapas de separación convencionales (por ejemplo: extracción con solventes, adsorción y destilación). Lo anterior se basa en que la extracción con fluidos supercríticos presenta velocidades de transferencia de masa más favorables que la extracción convencional a base de solventes, al poseer mayor coeficiente de difusión de solutos y menor viscosidad del fluido. Además, los fluidos supercríticos pueden exhibir incrementos en el poder de solvente para algunos solutos por varios órdenes de magnitud a presiones y temperaturas altas, lo anterior se cree es el resultado del efecto acumulativo por incrementar la presión de vapor del soluto debido al incremento de la temperatura y el incremento de la densidad del fluido supercrítico como resultado de incrementos en la presión (Rizvi y col. 1994; Kanel y Marentis, 2000).

En el área del procesamiento para la obtención de carotenoides y xantofilas (luteína) Favati y col. (1988), aplicaron ésta tecnología utilizando CO₂ supercrítico sobre un concentrado proteico de hojas, y sus resultados demuestran la factibilidad de obtener extractos enriquecidos con carotenoides específicos pudiendo ser usados directamente en el procesamiento de alimentos; más aún ellos demostraron que el producto sólido residual resultado del procesamiento con CO₂ supercrítico no afecta el potencial nutricional. Naranjo y col. (2001), evaluaron al CO₂ supercrítico como una alternativa a los procesos que utilizan hexano para la producción de oleorresina de flor de cempoalxochitl. La presencia de material liposoluble en las harinas de flor del cempoalxochitl requirió establecer la capacidad del CO₂ supercrítico para solubilizar los diésteres puros de luteína y evaluar el efecto de las diferentes variables sobre el proceso de solubilización. Los resultados muestran que se incrementa la solubilidad de los diésteres de luteína usando modificadores (metanol, etanol, isopropanol y *n*-butanol) comparado con CO₂ puro a la misma combinación de temperatura y presión. Para el metanol, etanol, isopropanol y *n*-butanol se dieron mayores rendimientos en la extracción, logrando hasta un 60% en el caso de CO₂ que contenía 5.9% de butanol, equivalente a un incremento de 2.4 veces la

solubilidad de los diésteres de luteína. El estudio no incluyó pruebas para alcoholes de mayor peso molecular debido a sus limitaciones como fluidos viscosos. Para el cloroformo, se obtuvo un incremento del 2.6 veces (65% de la cantidad extraída con hexano), mientras que con tetracloruro la solubilidad se hace casi nula. También probaron al hexano, sin embargo, el volumen que se utiliza es demasiado grande para manejarlo y no es posible lograr el porcentaje molar usado para el resto de las variables.

A pesar de estas ventajas, los sistemas de extracción con fluidos supercríticos son poco utilizados comercialmente, pudiendo ser citadas algunas aplicaciones pero éstas son minoría en comparación con el potencial de aplicación que puede alcanzar (Rizvi y col. 1994). La carencia de éxitos comerciales, basados en ésta metodología, se debe principalmente a los altos costos asociados con el equipo para la extracción con fluidos supercríticos. Adicionalmente se requiere un gran capital asociado con la recompresión de grandes volúmenes de solvente de extracción reciclado. Por otro lado, los pocos datos que existen sobre el comportamiento termodinámico de una mezcla solvente supercrítico-soluto, y la falta de información sobre ingeniería para el escalamiento y diseño de una planta de extracción supercrítica, limitan aún más la explotación de ésta tecnología a una escala comercial (Rizvi y col. 1994, Kanel y Marentis, 2000).

4.6.2. Tratamientos enzimáticos.

Actualmente, los tratamientos enzimáticos han llegado a ser una parte importante y en algunos casos indispensable de los procesos usados en la industria alimentaria moderna así como en la obtención de una gran diversidad de productos. Las principales ventajas ofrecidas por los procesos enzimáticos son: especificidad, condiciones de temperatura y pH moderados, el material se somete a tratamientos ligeros y los productos secundarios son escasos (Christensen, 1991). El uso de enzimas en la industria alimentaria se puede clasificar en tres ramas: extracción, licuefacción y procesos terminales. Los propósitos de introducir un proceso enzimático son variables: un nuevo producto cuya obtención es solo factible usando un método enzimático o un producto ya existente que puede ser obtenido enzimáticamente con un número menor de operaciones unitarias. En general se mencionan tres razones para la aplicación de enzimas a un proceso de extracción: mejorar los rendimientos, evitar el uso de solventes orgánicos, y facilitar los procesos de separación.

Bajo ésta filosofía Delgado-Vargas y Paredes-López (1997), realizaron un estudio del efecto de los tratamientos enzimáticos para la extracción de luteína a partir de flor de cempoalxochitl. Sus resultados muestran una elevada susceptibilidad en la extracción de toda la trans-luteína en muestras deshidratadas de flor de cempoalxochitl cuando es tratada enzimáticamente. En el estudio usan la enzima comercial ENCONASE-CEP que es una preparación de *endo*-1,4- β -D- glucanasa, celobiohidrolasa, y *exo*-1,4- β -D-glucosidasa. El tratamiento con esta enzima comercial sobre muestras sólidas al 5% (p/v) produce la harina de flor de cempoalxochitl con el mayor contenido de trans-luteína total (25.1 g/kg peso seco). Estos resultados permiten considerar a este proceso como una alternativa viable para la extracción de xantofilas.

En el mismo esquema, un grupo de investigadores de la UNAM liderados por el Dr. Agustín López Munguía, desarrollaron un proceso para realizar la extracción enzimática de pigmentos liposolubles a partir de materia vegetal. La factibilidad del estudio permitió la generación de una patente de propiedad industrial a favor de la empresa Bioquimex, S.A de C.V., derivada del convenio para desarrollar un proceso enzimático para la extracción de xantofilas de la flor de cempoalxochitl. La idea principal fue proponer una alternativa viable de extracción para incrementar los rendimientos de proceso. Se desconoce cuáles son los éxitos alcanzados por parte de la empresa con el uso de ésta tecnología. En la misma línea de investigación, Barzana y col. (2002), desarrollaron un proceso novedoso para la extracción de oleorresina a partir de flores del cempoalxochitl frescas molidas. El éxito que obtuvieron se debe al tratamiento enzimático que recibió la flor simultáneamente con la extracción con solventes en una sola etapa. La ventaja principal de este método consiste en eliminar las operaciones de ensilado y secado, las cuales suelen ser ineficientes, contribuyen a la generación de efluentes acuosos que representan una etapa más (como se observa en los procesos tradicionales) y que favorecen la degradación significativa de los carotenoides. Los resultados obtenidos de éste proceso muestran que se pueden obtener altos rendimientos de carotenoides (>85%) utilizando diferentes arreglos y escalas en contenedores simples con agitación. Sin embargo, la capacidad del sistema se ve limitada por la velocidad de agitación para obtener una mezcla adecuada de sólidos dispersos. A pesar de ello, el alto valor agregado del producto, el incremento de los rendimientos de la

reacción y la ausencia de consecuencias ambientales adversas hace de éste un proceso atractivo como alternativa a los procesos tradicionales.

4.6.3. Extracción con solventes.

En general, la extracción o lixiviación con solventes, es la operación unitaria utilizada con mayor frecuencia para la extracción de componentes de interés contenidos en materiales sólidos. Los compuestos a separar de la matriz sólida pueden estar incorporados, combinados químicamente, adsorbidos o bien mantenidos mecánicamente dentro de la estructura del material sólido.

Khachik (2001), propuso una estrategia usando n-hexano como solvente de extracción, una etapa posterior de saponificación y una recristalización empleando diclorometano y n-hexano como solventes para obtener luteína con una pureza del 97% ó mayor y 3-6% de zeaxantina. Sin embargo, esta metodología tiene la desventaja de utilizar solventes peligrosos y llevarse a cabo en largos periodos de tiempo para alcanzar los rendimientos descritos. En esta misma línea de investigación, Ausich y Sanders (1997), propusieron un proceso empleando propietilenglicol (40.9% peso) y un álcali acuoso (18.2% peso) para saponificar un extracto obtenido de pétalos de cempoalxochitl a base de hexano (49.9% peso de oleorresina) obteniendo productos con una pureza del 70-85%. El proceso se llevó a cabo a temperaturas de 70-80 °C durante 10 horas, lo que puede dar como resultado degradación o isomerización de componentes. Khachik (2001), propuso un esquema conveniente y económico para aislar y purificar xantofilas a partir de flor del cempoalxochitl. La metodología se basa en realizar la extracción y saponificación de manera simultánea a temperatura ambiente por algunas horas, obteniendo productos con una pureza del 97% o mayor. Durante el proceso, las muestras de cempoalxochitl son mezcladas con tetrahidrofurano, etanol e hidróxido de sodio o potasio, la solución resultante presenta un pH de 12 y es homogeneizada a temperatura ambiente por una a dos horas. Como resultado se obtuvieron las xantofilas libres de ácidos grasos con un contenido mínimo del 97% de luteína. Esta metodología ha sido también empleada con mucho éxito para aislar luteína, zeaxantina y otros oxicarotenoides y carotenoides a partir de vegetales (Khachik, 2001).

4.6.4. Lixiviación con hexano.

La lixiviación con hexano es la operación utilizada en la extracción comercial de xantofilas a partir de flor del cempoalxochitl (Alcosa, S.A. de C.V). La metodología utilizada es similar a la desarrollada en la industria de producción de aceites, que consiste de un sistema combinado de extrusión y extracción con hexano. La materia prima utilizada es flor seca pelletizada (pellets de 0.25 a 0.4 mm) para aumentar área de contacto y para hacer más efectiva la extracción. Los pellets son lixiviados en un extractor a contracorriente usando hexano como disolvente, de este se obtiene una miscela (oleorresina más hexano) y un sólido agotado. La miscela se concentra por destilación rápida donde se elimina el hexano, el producto resultante es una oleorresina que consiste de xantofilas esterificadas con ácidos grasos (principalmente esteárico, mirístico y palmítico), en concentración promedio de 90-100 gramos por kilogramo de extracto y un perfil del 82-86 % de trans-luteína y del 4-6% de trans-zeaxantina como principales xantofilas.

El éxito de la operación de lixiviación depende de cualquier pre-tratamiento que se le pueda dar al sólido para facilitar la transferencia de masa e incrementar los rendimientos en la extracción. En algunos casos las pequeñas partículas del material soluble están completamente rodeadas de una matriz de materia insoluble. El disolvente se debe difundir en la masa y la solución restante se debe difundir hacia el exterior antes de poder lograr una separación. En el tratamiento de material a lixiviar que tiene una estructura celular, los productos a extraer se encuentran generalmente dentro de las células; si las paredes celulares permanecen intactas después de la exposición a un disolvente adecuado, entonces se limita la velocidad de transferencia de masa. En estos casos se tiene que realizar la lisis celular para disminuir la resistencia a la transferencia de masa y elevar los rendimientos de la extracción (Treybal, 1995). De manera breve, la extracción comercial de xantofilas a partir de la flor del cempoalxochitl consta de las siguientes etapas: ensilado, secado, extracción con hexano y saponificación. De éstas, la etapa crítica que determina la eficiencia general del proceso es el ensilado, debido a los cambios estructurales de las células vegetales por la acción enzimática de los microorganismos saprófitos asociados a la flor de cempoalxochitl. Esta etapa consta de dos fases, en la primera se lleva a cabo la respiración aeróbica en donde los carbohidratos solubles en el tejido de la planta se oxidan y se convierten en dióxido de carbono y agua. Este proceso se da hasta que el nivel de

oxígeno es nulo o hasta que se consumen por completo los carbohidratos. En condiciones ideales, con un empacado y sellado perfectos del material de ensilado, la respiración sólo dura unas horas. El crecimiento de microorganismos durante este periodo se limita a aquellos que se desarrollen en un medio con oxígeno. Generalmente, esto incluye a bacterias aerobias, anaerobias facultativas, levaduras y hongos los cuales metabolizan azúcares a dióxido de carbono, calor y agua. En la segunda fase se establecen las condiciones anaerobias, y por consiguiente proliferan las bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas. Las primeras poblaciones que se establecen son generalmente las enterobacterias y las bacterias lácticas heterofermentativas. Estos organismos producen principalmente ácido acético, etanol, ácido láctico y dióxido de carbono de la fermentación de glucosa y fructosa. Cuando el pH empieza a decaer, se da un marcado incremento en la población de bacterias lácticas homofermentativas, las cuales producen principalmente ácido láctico. El rápido incremento en el nivel de ácido láctico da como resultado un decremento del pH hasta alrededor de 4. En este punto, el producto ensilado generalmente permanece estable durante su almacenamiento.

El cambio bioquímico más importante que se manifiesta durante el ensilado de la flor es la depolimerización del material que compone las paredes de las células. Un análisis proximal de los pétalos de las flores muestra como componentes principales a la celulosa y hemicelulosa (Figura 4.8).

La celulosa, independiente de la especie vegetal, es un polímero no ramificado que consta desde 1000 hasta un millón de unidades de D-glucosa, unidas por enlaces beta-1,4 glicosídicos. La diferencia radica en la estructura de los cristales y en los enlaces con otros compuestos.

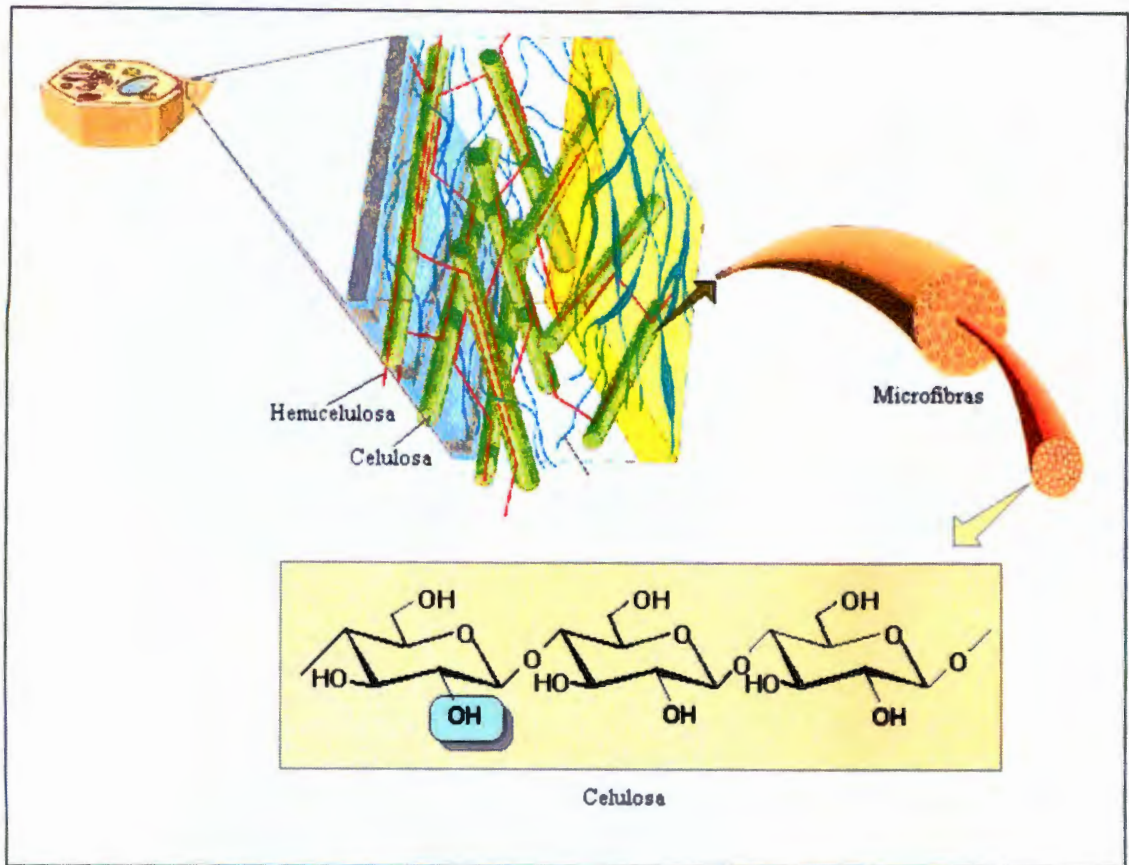


Figura 4.8. Corte transversal de la pared celular vegetal

Existen dos tipos de enlaces de hidrógeno en las moléculas de celulosa: aquellos que se forman entre el grupo C_3OH y el oxígeno del anillo de piranosa dentro de la misma molécula, y los que se forman entre el grupo C_6OH de una molécula y el oxígeno del enlace glicosídico de otra. En general, los enlaces β -1,4 glicosídicos no son muy difíciles de romper, sin embargo, gracias a estos enlaces de hidrógeno, la celulosa puede formar cristales. Estos cristales se encuentran tan comprimidos que no permiten la penetración de agua o de enzimas, a excepción de la exoglucanasa, que pertenece a un subgrupo de la celulasa, y ataca los enlaces glicosídicos terminales. La incapacidad de penetración del agua en la celulosa da como resultado la insolubilidad de los cristales de celulosa. Por otra parte, la celulosa amorfa permite la penetración de la endoglucanasa, otro subgrupo de la celulasa que cataliza la hidrólisis de los enlaces internos (Figura 4.9).

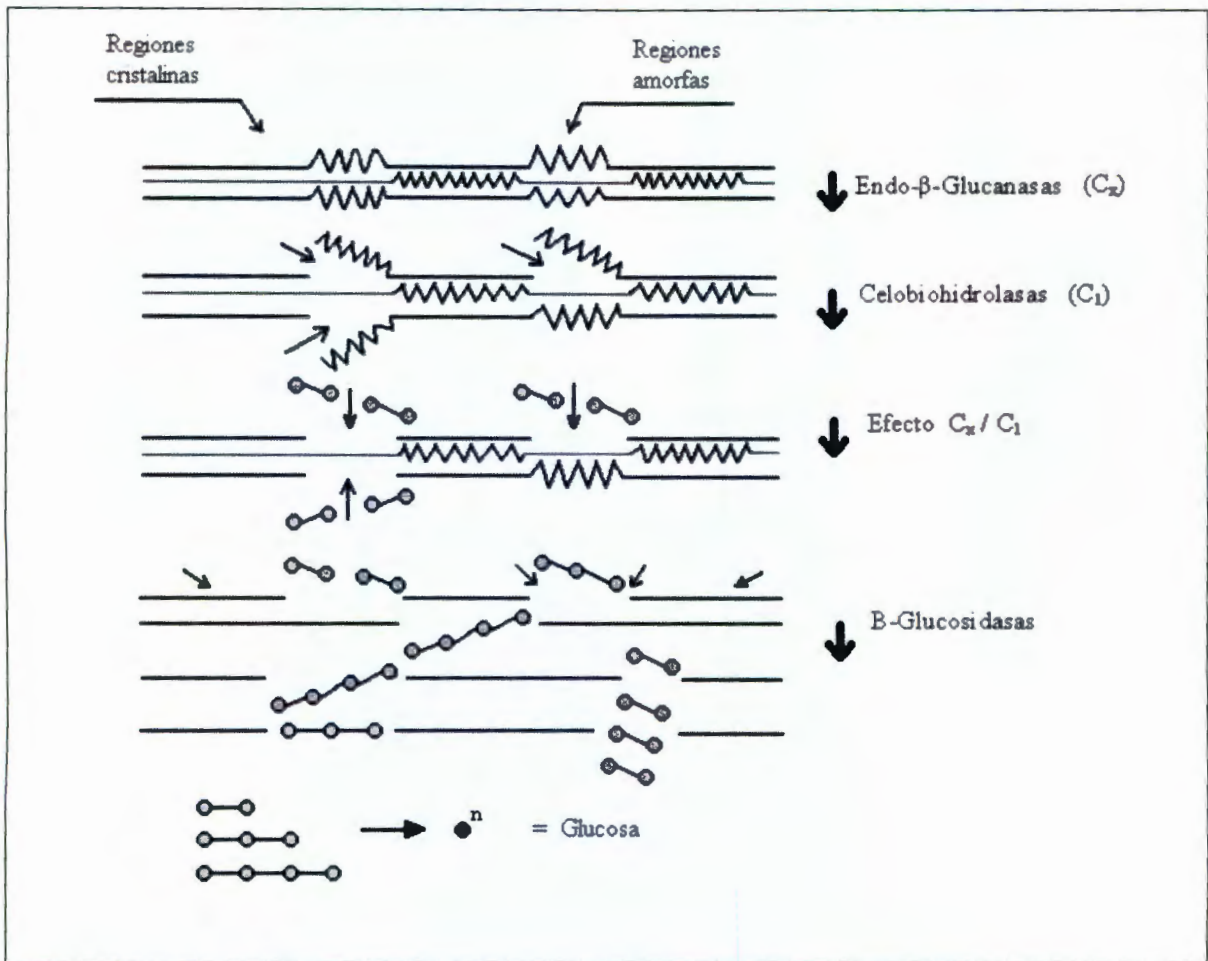


Figura 4.9. Mecanismo de hidrólisis enzimática de la celulosa (Nidetzky y Steiner, 1993).

La consecuencia natural de la diferencia en la estructura de estos compuestos es que la velocidad de hidrólisis es mucho mayor para la celulosa amorfa que para los cristales de celulosa. El proceso de rompimiento de los enlaces glicosídicos que mantienen unidas a las unidades básicas de glucosa se lleva a cabo mediante un mecanismo de hidrólisis catalítica (Walker y Wilson, 1991; Goyal y col. 1991; Nidetzky y Steiner, 1993) en donde la celulosa produce la rotura de los enlaces β -1,4 glicosídicos del polímero celulósico. Las investigaciones actuales proponen el mecanismo de reacción mostrado en la figura 4.9.

La figura muestra varias etapas: la primera consiste en la degradación hidrolítica de las regiones amorfas, por medio de las endoglucanasas, que atacan de forma aleatoria el

enlace β -1,4 glicosídico de las regiones amorfas del polímero de celulosa, produciendo múltiples cadenas de polímeros de diversas longitudes. En la etapa siguiente actúan las celobiohidrolasas o exoglucanasas, cuya acción se limita al extremo no reductor de la cadena, presentando una elevada actividad frente a la celulosa amorfa y dando como producto celobiosa (dímero de β -1,4-glucosa). Esta enzima presenta gran afinidad por la celulosa, por lo que también degrada lentamente las cadenas terminales no reductoras de las regiones cristalinas accesibles del polímero, produciendo celobiosa. Finalmente las β -glucosidasas hidrolizan las cadenas de celobiosa y celo-oligosacáridos solubles, produciendo glucosa. Este proceso no sólo completa la degradación de la celulosa, sino que elimina la acumulación de celobiosa que actuaría como inhibidor de las celobiohidrolasas, en la segunda etapa del mecanismo de hidrólisis.

Con base a lo anterior, Matoushek (1974); Delgado-Vargas y Paredes-López (1997) y Barzana y col. (2002) realizaron trabajos mediante tratamientos enzimáticos con actividades celulolíticas a fin de depolimerizar los componentes estructurales e incrementar la permeabilidad celular. Los resultados muestran que este tratamiento permite obtener harinas de flor del cempoalxochitl con rendimientos en la extracción de xantofilas mayores a los otros métodos descritos. Sin embargo, estos procesos presentan grandes limitaciones, siendo una de ellas el uso de enzimas comerciales que implican altos costos.

A pesar de los resultados alentadores descritos, el proceso de ensilado aun permanece sin comprender. En este trabajo se estudia el ensilado de la flor del cempoalxochitl con enfoque de proceso de fermentación en fase sólida como pre-tratamiento para incrementar los rendimientos de la extracción de xantofilas totales.

4.6.5. Fermentación en estado sólido (FES); consideraciones generales

La FES se distingue de la fermentación sumergida porque el crecimiento de microorganismos y la formación de productos se llevan a cabo en la superficie de un material sólido en ausencia de agua libre. Independiente del tipo de fermentación, todos los sistemas incluyen, un sistema biológico, un substrato y un equipo que permita el control de variables.

4.6.5.1. Microorganismos

Las bacterias, levaduras y hongos pueden crecer en sustratos sólidos y tener aplicación en los procesos FES. Las bacterias están involucradas principalmente en el composteo, el ensilado y en algunos procesos de alimentos. Las levaduras se pueden usar para producción de etanol y alimentos fermentados. Los hongos filamentosos son los que se adaptan mejor para la FES dominando los campos de trabajos de investigación y procesos de desarrollo debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas. El crecimiento en forma de hifas de los hongos y su buena tolerancia a la baja actividad de agua (A_w) y a condiciones de alta presión osmótica, los hacen eficientes y competitivos. El crecimiento de hifas incrementa la colonización de sustratos sólidos y la utilización de nutrientes comparado con los organismos unicelulares. El modelo básico de crecimiento de hongos es una combinación de la extensión apical de los extremos de las hifas y la generación de nuevas puntas de hifas por medio de ramificación. Las enzimas hidrolíticas se excretan en el extremo de la hifa que facilita su acción y permite la penetración en la mayoría de los sustratos sólidos. La catálisis resultante del contacto es muy eficiente y los productos accesibles al micelio para promover la biosíntesis y las actividades metabólicas (Roussos y Perraud-Gaime, 1996; Raimbault, 1998).

4.6.5.2. Sustratos

Todos los sustratos sólidos tienen una característica en común: su estructura macromolecular básica. Dicha estructura (por ejemplo, celulosa, almidón, pectina, lignocelulosa, fibras, etc.) confiere al sustrato las propiedades de un sólido. La macromolécula estructural simplemente puede proveer una matriz inerte (bagazo de caña de azúcar, fibras inertes, resinas) dentro de la cual se absorban las fuentes de carbono y energía (azúcares, lípidos, ácidos orgánicos). Pero, generalmente, la matriz macromolecular representa el sustrato, suministrando también la fuente de carbono y energía. El problema más importante de la FES es su alta heterogeneidad que dificulta el enfoque de sólo una categoría de procesos hidrolíticos y da como resultado ensayos pobres de modelamiento. Esta heterogeneidad es de diferente naturaleza: estructura irregular del sustrato (mezcla de almidón, lignocelulosa, pectina), variabilidad entre lotes de sustratos, limitando la reproducibilidad, dificultad al mezclar la masa sólida en la fermentación, para

evitar la compactación, lo que causa un crecimiento no uniforme, gradientes de temperatura, pH y humedad, que hacen casi imposible obtener muestras representativas. Cada tipo de sustrato macromolecular presenta diferentes tipos de heterogeneidad. En general, el sustrato debe tener una gran área de superficie por unidad de volumen (en el rango de 10^3 a 10^6 m²/cm³), a mayor área de superficie (menor tamaño) mayor rendimiento de productos, incremento de la biomasa y transformación del sustrato. Esta característica favorece el intercambio de gases (aire-humedad-dióxido de carbono), la transferencia de calor y masa. Un tamaño menor de 10^3 los sustratos presentan poca porosidad que limita el crecimiento y utilización del sustrato por efectos de compactación que reduce el área de superficie efectiva. Además, los sustratos deben poseer la capacidad de absorber agua y alcanzar una actividad de agua determinada, baja tendencia a la aglomeración que limite los mecanismos difusionales para la transferencia de masa (Hesseltine, 1972; Mudgett, 1980; Pandey, 1991; Ramana y col. 1993; Gunasekaran y col. 1996; Sun Tao y col. 1997; Raimbault, 1998).

4.6.5.3. Factores ambientales

Los factores ambientales como la temperatura, pH, actividad de agua, niveles de oxígeno y concentración de nutrientes y productos, afectan significativamente el crecimiento microbiano y la formación de producto. En cultivos sumergidos con agitación, el control del entorno es relativamente simple debido a la homogeneidad de la suspensión de las células microbianas y de la solución de nutrientes y productos en la fase líquida. El bajo contenido de humedad de la FES permite un volumen de reactor por masa de sustrato menor que en la fermentación sumergida, y también simplifica la recuperación del producto. De cualquier manera, los problemas serios se dan en el mezclado, intercambio de calor, transferencia de oxígeno, control de humedad y gradientes de pH, nutrientes y productos, como consecuencia de la heterogeneidad del producto (Sargantanis y col. 1993).

Esta última característica de la FES da como resultado que la medición y el control de los parámetros antes mencionados sean difíciles, laboriosos y a menudo imprecisos, limitando el potencial industrial de esta tecnología. Debido a estos problemas, los microorganismos que se seleccionan para la FES son los más tolerantes a un amplio campo de condiciones de cultivo (Aidoo, 1982; Mudgett, 1986; Auria, 1992; Lonsane y col. 1992).

4.6.5.4. Contenido de humedad y actividad de agua (A_w)

El agua presente en los sistemas de FES existe en una forma compleja dentro de la matriz sólida o como una capa delgada, ya sea que esté absorbida en la superficie de las partículas o que sea límite de las regiones capilares del sólido. El agua libre sólo se presenta una vez que se sobrepasa la capacidad de saturación de la matriz sólida. De cualquier modo, el nivel de humedad al que la humedad libre se logra apreciar varía considerablemente entre los sustratos y depende de sus características de enlazamiento de agua.

El agua libre aparece una vez que la capacidad de saturación de la matriz sólida es excedida y varía considerablemente entre diferentes sustratos en un rango de 30 a 85%. Actualmente se utiliza el parámetro de actividad de agua A_w referida a los requerimientos de agua por parte de los microorganismos más que el contenido de humedad en el sustrato sólido y representa el agua disponible para la reacción biológica y por consiguiente un marcado efecto sobre el crecimiento microbiano. Así por ejemplo, la A_w es del orden del 0.65 a 0.75 para los hongos (Mudgett, 1980; Roussos y Perraud-Gaime, 1996; Raimbault, 1998; Souza y col. 1999; Pandey y col. 2000).

4.6.5.5. Temperatura y transferencia de calor

La remoción de calor es probablemente el factor crucial en los procesos de FES. Los aparatos convencionales de enfriamiento por convección o conducción no son adecuados para disipar el calor que se genera en el metabolismo, debido a la pobre conductividad térmica de la mayoría de los sustratos sólidos que dan como resultado gradientes de temperatura inaceptables. Solamente los aparatos de enfriamiento por evaporación proveen de una capacidad suficiente para eliminar el calor. Aunque la función principal de la aireación durante el cultivo aeróbico en estado sólido era suministrar oxígeno para el crecimiento celular y eliminar el dióxido de carbono producido, también sirve como una función crítica en la transferencia de calor y humedad entre la fase sólida y la gaseosa. Sin embargo, el proceso más eficiente para controlar la temperatura es la evaporación del agua. En general, mantener constantes simultáneamente la temperatura y el contenido de humedad en FES a gran escala es difícil, pero se puede lograr usando el sistema adecuado de FES (Andre y col. 1981; Lonzane y col. 1985; Moo-Young y Blanch,

1987; Pandey, 1991; Ramana y col. 1993; Saucedo-Casteñeda y col. 1990; Sun tao y col. 1997).

4.6.5.6. Aireación

La aireación tiene cuatro funciones principales en la FES: (i) mantener las condiciones aeróbicas, (ii) desorber el dióxido de carbono, (iii) regular la temperatura del sustrato y (iv) regular el nivel de humedad. El entorno gaseoso puede afectar significativamente los niveles relativos de biomasa y la producción de enzimas. En fermentaciones sumergidas, el suministro de oxígeno es a menudo el factor limitante del crecimiento debido a la baja solubilidad del oxígeno en el agua. Por el contrario, un proceso en estado sólido permite un libre acceso del oxígeno atmosférico al sustrato. Por lo tanto, la aireación puede ser más fácil que en los cultivos sumergidos debido a la rapidez de la difusión del oxígeno en la película del agua que rodea a las partículas insolubles del sustrato, y también por la gran superficie de contacto entre la fase gaseosa, el sustrato y el micelio aéreo (Auria, 1992; Saucedo-Castañeda y col. 1990). El control de la fase gaseosa y el flujo de aire en un medio simple y práctico para regular la transferencia de gas y generalmente no se observa limitación de oxígeno en la FES cuando el sustrato está formado por partículas. Por medio de este simple proceso de aireación también es posible inducir las reacciones metabólicas, debidas ya sea a la tensión del agua, tensión de calor o cambios de temperatura, de todos los procesos que puedan cambiar drásticamente su comportamiento bioquímico o metabólico (Auria, 1992; Saucedo-Castañeda y col. 1990).

Estas características hacen que la medición y control de variables de proceso sean limitantes para caracterizar estos procesos. La falta de información confiable y la carencia de datos de ingeniería limitan el avance en el diseño de equipos (Hardin y col. 2000). Sin embargo, esto no ha sido obstáculo para frenar el desarrollo de nuevas versiones de biorreactores para los procesos de FES, los cuales pueden ser agrupados en dos categorías: sistemas estáticos y sistemas agitados (Mitchell y col. 2000). En los sistemas estáticos, el medio sólido permanece estacionario desde el principio hasta el final del proceso de fermentación (ejemplos de sistemas estáticos usados para FES incluye frascos, cajas petri, charolas, columnas de lecho fijo y cámaras; Figura 4.10-a y 4.10-b). En estos sistemas, los mecanismos para la transferencia de masa y calor son por difusión. Durante la fermentación

el substrato se contrae y se altera la porosidad limitando los mecanismos difusionales. Además se incrementa temperatura que inhibe el desarrollo microbiano y disminuye el rendimiento de productos (Gowthaman y col. 1993; Rajagopalan y Modak, 1994; George y col. 1995; Mitchell y col. 2000). Los sistemas agitados contienen un dispositivo para mezclar el medio sólido durante el proceso de fermentación. Las características principales es reducir la heterogeneidad del sistema, disminuye los gradientes de masa y calor, favorece el crecimiento microbiano y se incrementan los rendimientos del proceso (ejemplo de un sistema agitado es un tambor rotatorio; Figura 4.10-c) (Aidoo y col. 1982; Pandey, 1991; Ramana y col. 1993; Stuart y col. 1999; Hardin y col. 2000; Marsh y col. 2000; Surynarayan y Mazumdar, 2001).

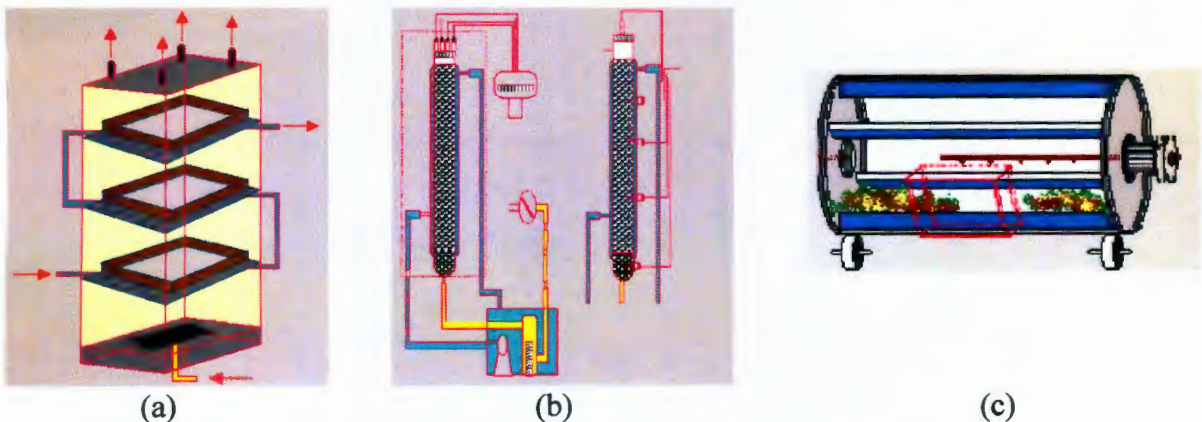


Figura 4.10. Equipos comunes utilizados en fermentación en estado sólido.

El mayor problema que se presenta en las diferentes versiones de biorreactores (estáticos o agitados), es el control de temperatura en el sistema. Con frecuencia se utiliza la aireación para evitar la acumulación de calor, pero a la vez remueve el agua de la matriz sólida. Una alternativa para evitar los gradientes de temperatura dentro del sistema es por la acción de interacción entre la aireación y mezclado, que además favorece la transferencia de masa y reduce la heterogeneidad en el sistema. Sin embargo, esta interacción (aireación-mezclado) induce efectos adversos en la porosidad con tendencias a compactar el substrato, destrucción de la unión substrato-micelio (hifas) y daño de microorganismos.

Con base en lo anterior y considerando lo complejo de caracterizar este tipo de procesos, el presente trabajo muestra una alternativa para caracterizar la fermentación en estado sólido de la flor del cempoalxochitl para facilitar la extracción de sus agentes pigmentantes (xantofilas) (figura 4.11).

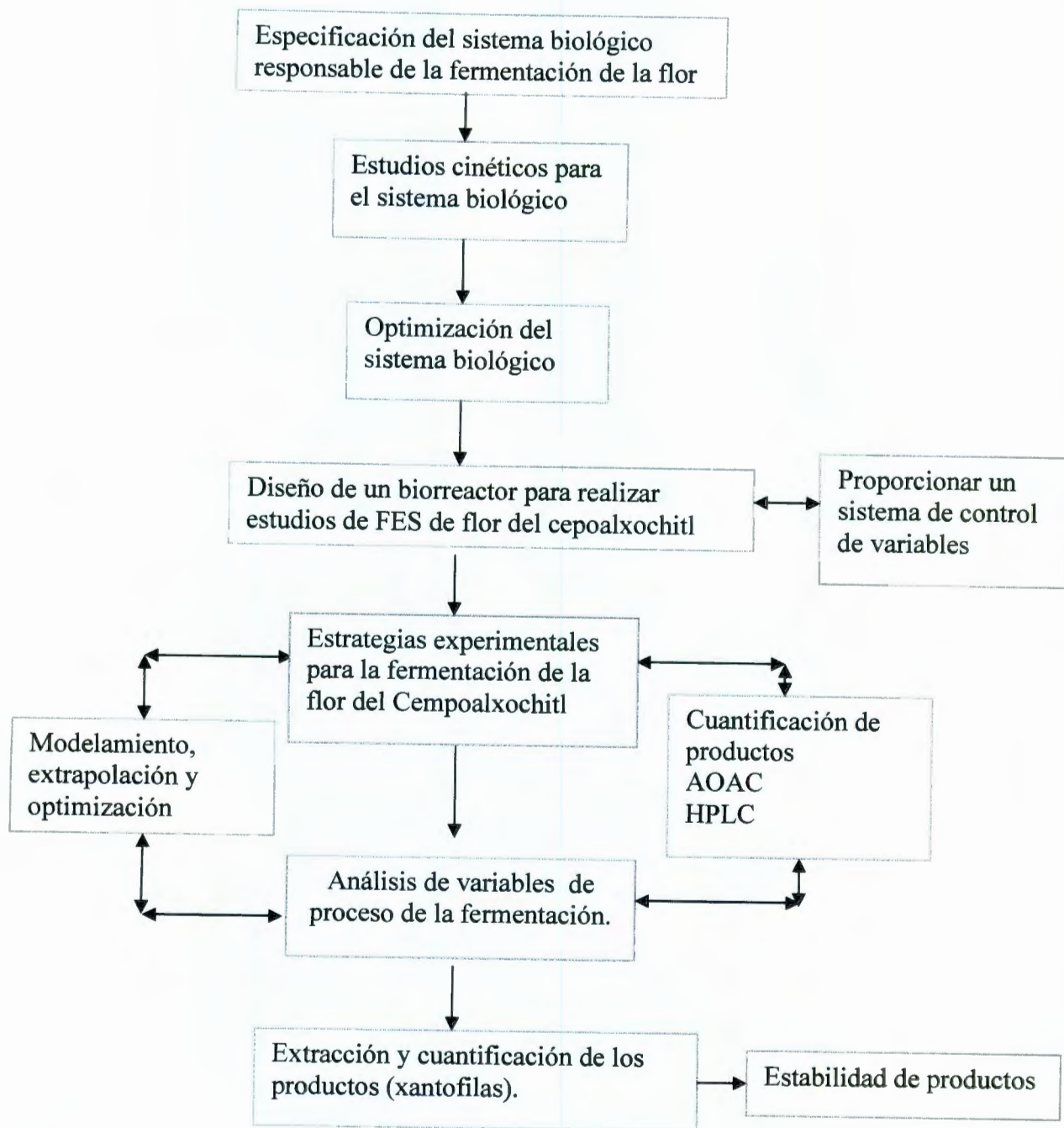


Figura 4.11. Esquema general para la caracterización de un proceso de FES.

V. HIPÓTESIS:

5.1. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

La fermentación en fase sólida de la flor del cempoalxochitl con inóculos bacterianos seleccionados, es capaz de aumentar, en forma significativa, los rendimientos de xantofilas sin detrimento del producto. Como consecuencia de lo anterior, La fermentación en estado sólido de la flor del cempoalxochitl será superior en rendimiento y calidad de las xantofilas al ensilado o fermentación anaerobia tradicional.

5.2. HIPÓTESIS NULA

No existen evidencias significativas que indiquen una mejora sustancial entre los rendimientos de los productos fermentados via estado sólido comparados con los rendimientos de los productos obtenidos por fermentación tradicional o ensilado.

VI. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollo y optimización de un proceso de fermentación en fase sólida, a nivel laboratorio, como pre-tratamiento para la obtención de productos fermentados que permitan altos rendimientos en la extracción de xantofilas totales a partir de flor del cempoalxochitl.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislamiento, identificación y selección del(os) microorganismo(s) asociados al cempoalxochitl implicados en el proceso de ensilado.
- Estudio de la cinética de crecimiento y actividad enzimática del(os) microorganismo(s) seleccionados.
- Caracterizar el(los) cultivo(s) y determinar la edad óptima de propagación para el análisis del ensilado y fermentación en estado sólido.
- Desarrollo de una metodología para la optimización del inóculo.
- Diseño y construcción de un fermentador en fase sólida.
- Análisis y cuantificación de las variables críticas de operación en el proceso de fermentación en estado sólido de flor de cempoalxochitl.
- Optimización del proceso de fermentación de flor de cempoalxochitl que maximice los rendimientos de la extracción de xantofilas totales.
- Evaluar el efecto del tratamiento enzimático obtenidos a partir de los microorganismos asociados a la flor del cempoalxochitl.
- Establecer la relación entre el tratamiento enzimático y el rendimiento de la extracción de xantofilas totales.
- Evaluar los cambios de los componentes estructurales de la pared celular vegetal asociados a la actividad enzimática.
- Estudio y optimización del proceso de extracción de xantofilas totales a partir de harina de flor de cempoalxochitl.

VII. METODOLOGIA

Se proponen cuatro etapas para el desarrollo del proyecto para alcanzar los objetivos planteados y comprobar las hipótesis.

Etapa 1. Investigación bibliográfica

Comprende la búsqueda de información, a través de bibliografía especializada, sobre colorantes, especialmente los contenidos en la flor del cempoalxochitl, sus usos potenciales, los principales campos de aplicación (alimentaria, sector salud, farmacéutico, etc.), alternativas de producción, obtención, optimización y cuantificación de xantofilas. Consideraciones generales de los procesos de fermentación en fase sólida, sistemas, variables y control.

Etapa 2. Caracterización del sistema biológico a utilizar en la fermentación en estado sólido de flor de cempoalxochitl.

Comprende el aislamiento, identificación y selección de lo(s) microorganismos(s) saprófitos asociados a la flor del cempoalxochitl responsables de la fermentación (pudrición). Esta etapa incluye:

- Aislar los microorganismos saprófitos del cempoalxochitl.
- Identificar mediante pruebas Bioquímicas y técnicas de microcultivo los microorganismos aislados.
- Estudiar las cinéticas de crecimiento y actividad enzimática.
- Seleccionar con base a los estudios de actividad enzimática y ensilado los microorganismos causantes de la fermentación de la flor.
- Optimizar el cultivo para los estudios de ensilado y fermentación en estado sólido.

Etapa 3. Análisis del proceso de fermentación en estado sólido de flor de cempoalxochitl.

Comprende el diseño, construcción e instalación del fermentador para caracterizar el proceso de fermentación de la flor del cempoalxochitl y el análisis de variables de fermentación. La etapa incluye:

- Plantear y desarrollar una estrategia de optimización de variables con base a la construcción de esquemas experimentales diseñados y el uso de la metodología de superficie de respuesta.
- Análisis de las variables y la optimización del proceso.

Etapa 4. Estudio del proceso de lixiviación de xantofilas totales a partir de harina de flor del cempoalxochitl.

Comprende el estudio de la extracción de xantofilas totales de harina de flor del cempoalxochitl con hexano y definir el comportamiento de distribución de xantofilas en el sistema harina-hexano en un sistema a contracorriente para establecer el prediseño que permita altos rendimientos de extracción.

La etapa incluye:

- Definir y analizar las variables críticas de operación en el proceso de extracción sólido-líquido.
- Plantear y desarrollar una estrategia experimental basada en la metodología de superficie de respuesta para optimizar en el proceso de extracción.
- Analizar la distribución de xantofilas en un proceso de extracción a contracorriente en múltiples etapas basados en el sistema de Shank.
- Especificar las bases para el prediseño del proceso.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. MATERIALES.

8.1.1. Materia prima: flor de cempoalxochitl

Flor fresca del cempoalxochitl (*Tagetes erecta*) proporcionada por Industrias Alcosa, S.A. de C.V., se utilizó en todos los ensayos experimentales. El lote de materia prima presentó una relación promedio de flores con pétalos amarillo - naranja del 10:90 y 30 (± 2)% peso en promedio de receptáculo. A una parte del lote, los pétalos se separaron de sus receptáculos y se mezclaron hasta obtener una muestra homogénea. El material fresco se colocó en bolsas de polietileno negras selladas a vacío y se almacenaron a 4 °C para conservar el material fresco hasta su uso.

8.1.2. Harina de flor del cempoalxochitl.

Muestras de flor fresca y fermentada del cempoalxochitl se secaron bajo condiciones suaves de temperatura (55°C) en una estufa de vacío (Sep lab. Modelo 1430) hasta alcanzar un contenido de humedad del 10% (± 1) en promedio. Las muestras secas se molieron 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 (apartado 8.2.4) y los ensayos de extracción de xantofilas a base de solventes.

8.1.3. Oleorresina de flor de cempoalxochitl

Las muestras de harina se lixiviaron con hexano grado analítico (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ) en condiciones suaves de temperatura (35 °C) durante 20 minutos. Cuando la extracción concluyó, la fase líquida se separó por centrifugación a 6000 rpm (Hermle modelo Z383) obteniéndose una micela formada de xantofilas totales esterificadas con ácidos grasos disueltas en hexano. La solución se concentró en un rotaevaporador a 50 °C y 50 rpm (Büchi modelo RE111). El extracto resultante (oleorresina) se analizó y determinó la concentración de xantofilas totales

(apartado 8.2.5) y el perfil de concentración de xantofilas por cromatografía de líquidos (apartado 8.2.6).

8.1.4. Extracción y cuantificación de xantofilas totales de harina de flor del cempoalxochitl.

Las extracciones se realizaron con hexano grado analítico en condiciones basadas en diseño de experimentos. Al final de la extracción, las fases (lígeras y pesadas) fueron separadas por filtración. La fase ligera (líquido) se concentró en un rotaevaporador a 50 °C y 50 rpm (Büchi modelo RE111) y analizó para determinar la concentración de xantofilas (apartado 8.2.4) y el perfil de los componentes principales se obtuvo por HPLC (apartado 8.2.6). La fase pesada (sólido) se separó del solvente, el volumen de solvente retenido se determinó por diferencia de pesos (balanza analítica OHAUS modelo Explorer, precisión ± 0.0001 g) y el sólido libre de solvente se analizó y determinó la concentración de xantofilas (apartado 8.2.4).

8.1.5. Estándar de oleorresina de flor de cempoalxochitl.

Oleorresina comercial proporcionada por industrias Alcosa, S.A. de C.V., se analizó por HPLC para establecer el perfil y concentración de componentes. Los cromatogramas fueron analizados e identificadas las señales con base a estándares de referencia (Cuadro 8.1 y Figura 8.1).

8.1.6. Microorganismos.

Microorganismos endógenos saprofitos asociados a la de la flor de cempoalxochitl se aislaron (anexo 1) y parcialmente identificados (anexo 2) como: *Flavobacterium I1b* (C₁), *Acinetobacter anitratus* (C₂), *Enterobacter intermedius* (C₃), *Enterobacter aerogenes* (C₄), *Enterobacter agglomerans* (C₅), *Rhizopus nigricans* (H₁) y *Geotrichum candidum* (H₂).

Cuadro 8.1. Análisis del estándar de HPLC de oleorresina.

Pico	Tiempo (min)	Concentración (%)	Componente
4	1.971	0.3305	α -caroteno
9	3.428	0.8208	β -criptoxantina
17	4.799	0.4332	9-cis luteina
21	5.496	0.405	13-cis luteina
24	6.777	84.6655	Trans-luteina
25	7.524	4.6655	Trans-zeaxantina
27	8.731	2.5375	Tran-luteina-E
30	9.98	1.8968	9-Cis-luteina-E
31	10.151	2.5591	13-Cis-luteina-E
32	10.744	0.9416	Violaxantina
34	11.967	0.3836	Neoxantina
49	14.75	0.3879	No identificable

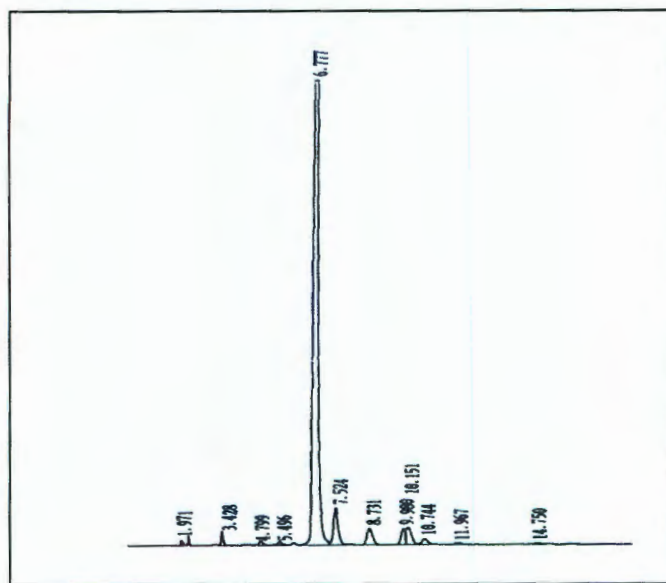


Figura 8.1. Estándar de oleorresina de flor de cempoalxochitl.

8.1.7. Sistema de fermentación de fase sólida.

A la fecha, no existen equipos comerciales para desarrollar procesos de fermentación en estado sólido y escasa es la información sobre configuraciones para el diseño de estos equipos. Para este trabajo, se diseñó un equipo de fermentación tipo tambor rotatorio, con base a las especificaciones de diseño de los fermentadores de tanque agitado. La idea principal es contar con un sistema que permita analizar y cuantificar las variables críticas de operación de estos procesos. El sistema de fermentación diseñado es modular, incluye puertos de adición de fluidos (líquidos y gases), control de temperatura y mecanismo de agitación, con regulador de velocidad. Además, el sistema está equipado con filtros de esterilización de aire, bombas peristálticas de velocidad variable, humidificador y analizador de gases (Figura 8.2.). Se construyó por Biotécnica S.A. de C.V.

8.1.8. Celulasa Comercial.

Celulasa comercial con actividad endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) de *Aspergillus niger* fue usada en los estudios de tratamiento enzimático. A fin de comparar y determinar la actividad del extracto sintetizado por los microorganismos saprofitos, soluciones enzimáticas al 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 y 0.001% (p/v) fueron preparadas y una curva de calibración elaborada. El pH de todas las soluciones fue ajustada a 5.0 (recomendada por la casa comercial) con ácido clorhídrico diluido (Beckman Instruments, Inc., Irvine, CA).

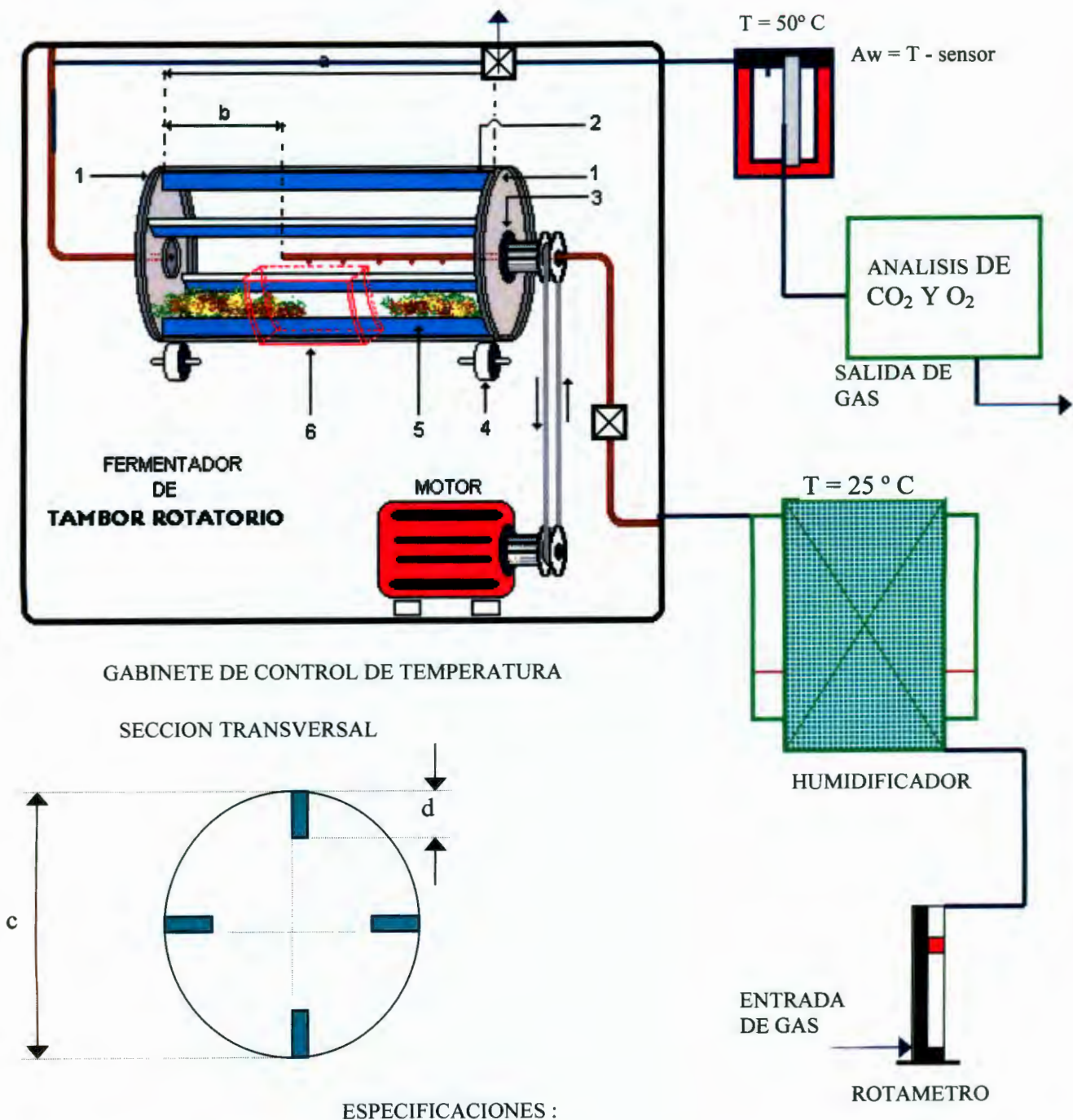


Figura 8.2. Esquema del diseño del sistema de fermentación de fase sólida.

8.2. MÉTODOS

6.2.1. Aislamiento de microorganismos.

El aislamiento de los microorganismos asociados a la flor del cempoalxochitl se realizó con la técnica de traslado directo de muestras de flor fresca, muestras obtenidas de la simulación del ensilado en el laboratorio y muestras recolectadas del ensilado industrial. En todos los casos, la técnica consistió en añadir pequeñas partes de las muestras sobre la superficie de medio de cultivo sólido (Agar Nutritivo y Agar Papa Dextrosa) e incubadas a temperaturas de 28 °C a 37 °C. Las colonias desarrolladas fueron sembradas en diferentes medios de cultivo hasta lograr aislar colonias con microorganismos puros. En cada siembra se realizaron observaciones al microscopio y analizaron las características morfológicas macroscópicas (tamaño, forma, color, consistencia, etc.) y microscópicas (forma, cápsulas, hifas, esporas, flagelos, etc.).

8.2.2. Identificación de bacterias.

Las bacterias aisladas, asociadas al cempoalxochitl, fueron parcialmente identificadas con base a los resultados de pruebas bioquímicas realizadas (apendice I):

Sistema API 20E

Sistema de identificación de enterobacterias y otros bacilos Gram negativos.

Sistema convencional de acuerdo al esquema de Pickett.

Sistema convencional de acuerdo al esquema de Weaver-Hollis para bacilos Gram negativos no fermentadores.

Sistema de identificación microbiológica VITEK de BioMerieux.

En todos los casos, las pruebas constan de microtubos que contienen substratos deshidratados. Se incuban con una suspensión bacteriana que hidrata el substrato (cuanto tiempo) y se analizaron cambios de color espontáneos o revelados por adición de reactivos. La lectura de las reacciones se analizó con base a tablas y la identificación mediante el índice y software (requiere mayor descripción).

8.2.3. Identificación de hongos.

En hongos, los principales criterios utilizados en su identificación fueron (apendice II):

Morfología de las hifas (septadas o no septadas).

Apariencia del micelio (transparente, oscuro, coloreado o incoloro).

Presencia de esporas.

Tipo de esporas (oosporas, zigosporas o ascosporas).

Esporas sexuales: esporangiosporas, conidios, o artrosporas (oidios).

Características de la cabeza esporal: tamaño, color, forma.

Cabezales esporales que poseen conidios: conidios simples, cadenas de conidios, conidios gemantes, o acúmulos de conidios; forma y disposición de los esterigmas o fiálides; conidios unidos entre sí por una sustancia gomosa.

Aspecto de los esporangióforos o conidióforos: simples o ramificados, si son ramificados, tipo de ramificación; tamaño y forma de la columela existente en el extremo del esporangióforo; conidióforos separados o formando haces.

Existencia de estructuras especializadas: estolones, rizoides, células basales, apófisis, clamidosporas, esclerocios, etc.

Para el análisis macro y microscópico se utilizó la técnica de microcultivo (cita).

8.2.4. Determinación de xantofilas totales en harina de flor de cempoalxochitl.

El método se basa en la extracción y cuantificación de xantofilas teniendo como referencia el método 970.64 del AOAC (1984).

Procedimiento:

Pesar con alrededor de 1 g de harina (0.372 mm de tamaño de partícula) y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Adicionar 60 mL de HEAT (Hexano (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ), Etanol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ), Acetona (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ) y Tolueno (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ)) y agitar por un minuto. Extractar durante 45 minutos a 56 °C, enfriar y ajustar el volumen a 100 mL con HEAT. Agitar por un minuto y dejar reposar durante 15 minutos. Transferir una alícuota de 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL que contiene 2 mL de hidróxido de potasio (Sigma

Chemical Co., St. Louis, MO) en metanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 40% y 20 mL de HEAT. Dejar reaccionar la mezcla durante 20 minutos a 56°C, enfriar y adicionar 30 mL de hexano, mezclar y ajustar el volumen a 100 mL con una solución acuosa de sulfato de sodio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 10%. Agitar por un minuto y dejar reposar en la obscuridad por 1 h para separar las fases inmiscibles. Transferir una alícuota de 5 mL de la epifase a un matraz volumétrico de 50 mL y ajustar el volumen con hexano, **agitar la mezcla y determinar la absorbancia a 474 nm.**

Cálculos:

$$\text{Xantofilas totales (g/kg)} = \frac{A_{474nm} \times 100 \times 50 \times 50 \times F}{236 \times W \times 10 \times 5}$$

dónde:

F = Factor de desviación del espectrofotómetro.

236 = Coeficiente de extinción de trans luteína en hexano a 474 nm.

W = Peso de la muestra (g).

8.2.5. Determinación de xantofilas totales en la oleorresina de flor de cempoalxochitl.

El método se basa en la extracción y cuantificación de xantofilas teniendo como base el método 970.64 del AOAC (1984).

Procedimiento:

Pesar con alrededor de 0.2 gramos de oleorresina a 18 °C y colocarla en un matraz volumétrico de 100 mL. Adicionar 60 mL de HEAT (Hexano, Etanol, Acetona y Tolueno) y agitar por 30 segundos. Ajustar el volumen con HEAT y agitar por 1 min. Transferir alícuota de 10 mL a un matraz volumétrico de 100 mL que contenga 2 mL de potasa metanólica al 40% y 20 mL de HEAT. Extraer a 56 °C durante 20 min. Enfriar y adicionar 30 mL de hexano. Ajustar el volumen a la marca con sulfato de sodio al 10% y agitar por un minuto. Dejar reposar en la oscuridad por una hora para la separación de las fases inmiscibles. Transferir una alícuota de 5 mL de la epifase a un matraz de 50 mL y ajustar a la marca con hexano. Mezclar y determinar la absorbancia a 474 nm.

Cálculos:

$$\text{Xantofilas totales (g/kg)} = \frac{A_{474} \times 100 \times 50 \times 50 \times F}{236 \times W \times 10 \times 5}$$

dónde:

A = Absorbancia a 474 nm.

F = Factor de desviación del espectrofotómetro.

236 = Coeficiente de extinción de trans luteína en hexano a 474 nm.

W = Peso de la muestra

8.2.6. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Para la cuantificación de los componentes en muestras se usó un cromatógrafo GBC modelo 9050, equipado con bomba cuaternaria y sistema desgasificador. Se inyectaron muestras que contenían 100 microlitros del extracto saponificado. Se llevó a cabo el análisis de carotenoides usando una columna de sílica OH (SGE BPX5 de SGE Internacional). Se manejó la elución del solvente con un flujo de 1.5 mL/min de una mezcla con 82.5% de hexano, 1.5% de isopropanol y 14% de acetato de etilo. La separación se realizó a temperatura ambiente. Las muestras inyectadas se monitorearon usando un detector UV-VIS a 447 nm, con tiempos de resolución de 1 segundo y resolución de la longitud de onda de 2 nm. Las señales en el cromatograma se asociaron a un componente en particular por medio de la comparación del tiempo de retención. El perfil de concentración de los componentes se obtuvo usando el porcentaje relativo del área de integración para cada señal y el área total de las señales obtenidas en el cromatograma de HPLC.

8.2.7. Estudios cinéticos

Las bacterias se sembraron en tubos inclinados de agar nutritivo (Difco-0003, Detroit, Mich.) y los hongos en agar de papa y dextrosa (Difco, Detroit, Mich.) a 28° C por 24 horas. La biomasa obtenida se transfirió a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de caldo nutritivo o de papa y dextrosa (bacterias y hongos respectivamente), incubadas en un agitador rotatorio a 28° C y 175 rpm (Forma Scientific, modelo 4520) por 30 horas. Se tomaron muestras cada 2 horas para estudios de cinética de crecimiento y de actividad enzimática.

8.2.8. Determinación de biomasa, método del peso seco.

Alícuotas de volumen constante de los matraces de propagación se filtraron en un sistema millipore usando membranas de 0.45 μm de tamaño de poro. Las membranas con microorganismos se secaron a 70 °C por 6 horas (Sep lab. Modelo 1430), se enfriaron en desecador por 2 h y se pesaron. Los ciclos de secado y enfriado fueron repetidos hasta que se obtuvo un registro de peso constante.

8.2.9. Obtención del extracto crudo de enzima.

Alícuotas de volumen constante de cada matraz de propagación se centrifugaron a 6000 rpm (Hermle, modelo Z383). El sobrenadante obtenido se usó como extracto crudo de celulasa (ϵ).

8.2.10. Evaluación de la actividad enzimática.

Alícuotas de 20 mL de extracto enzimático se adicionaron a 150 mL de una solución de carboximetil celulosa (CMC-high viscosity; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 5.25 % (p/v). La solución presentó una viscosidad de 2400 cp (Brookfield digital rheometer model DV-III+). Las mezclas enzima-CMC se mantuvieron a 28° C y 175 rpm en un agitador orbital (Forma Scientific, model 4520) por 24 h. Se estimó la actividad enzimática como función de la reducción de la viscosidad de la solución (η).

8.2.11. Propagación de cultivos microbianos.

Flavobacterium Iib (C_1), *Acinetobacter anitratus* (C_2), *Enterobacter aerogenes* (C_4) y *Rhizopus nigricans* (H_1) fueron identificados como los microorganismos saprofitos asociados al cempoalxochitl que producen celulasa. Las bacterias se sembraron en tubos inclinados de agar nutritivo (Difco-0003, Detroit, Mich.) y el hongo en agar de papa y dextrosa (Difco, Detroit, Mich.) a 28° C por 24 horas. La biomasa obtenida se transfirió a matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de caldo nutritivo o de papa y dextrosa (bacterias y hongo respectivamente), incubadas en un agitador rotatorio a 28° C y 175 rpm (Forma Scientific, modelo 4520). Los cultivos se propagaron hasta 16, 23, 16 y 26 h respectivamente. Tiempos óptimos de máxima producción de celulasa en este sistema.

Los cultivos fueron mezclados en las siguientes proporciones: *Flavobacterium Iib* 9.8%; *Acinetobacter anitratus* 41% and *Rhizopus nigricans* 49.2%.

8.2.12. Efecto del tratamiento enzimático.

Muestras de 10 g de pétalos frescos se mezclaron con 100 mL de extracto enzimático en matraces Erlenmeyer de 250 mL. La totalidad de las muestras se dividió en dos grupos. Un grupo se mantuvo en un agitador rotatorio (Forma Scientific, modelo 4520) a 28° C y 175 rpm por 24 horas; el otro se mantuvo a 28 °C sin agitación. Muestras de ambos grupos se tomaron a intervalos regulares de tiempo, se filtraron y analizaron las fases líquidas y sólidas por separado. La fase sólida se deshidrató en un horno al vacío (Shel Lab., modelo 1430) hasta alcanzar un contenido de humedad del 10% (± 1), se molieron (tamiz de 0.5 mm) usando un molino Brinkmann (Brinkmann, Wesbury, NY). La harina obtenida se analizó y se determinó la concentración de xantofilas totales (método 970.64 de la AOAC), se cuantificó la celulosa (Van Soest y Wine, 1968) y los componentes de la pared y contenido celular (Van Soest y Wine, 1967). La fase líquida se usó para evaluar la actividad enzimática residual.

8.2.13. Análisis de la actividad enzimática residual.

Las muestras tratadas con el extracto enzimático se filtraron y se separaron las fases. De la fase acuosa se tomaron alícuotas de 10 mL y se añadieron a 150 mL de CMC al 5.25% (p/v), se incubaron a 28° C y 175 rpm por 24 horas. Se evaluó la actividad enzimática residual de las muestras como función de la disminución de la viscosidad de la mezcla enzima-CMC.

8.2.14. Estudio del ensilado de la flor del cempoalxochitl.

Pétalos frescos de flor del cempoalxochitl esterilizados en autoclave (Brinkmann modelo 2540E) a 121 °C durante 15 min. se colocaron en cajas Petri y mezclaron con 10 mL de inóculo (composición definida con base a diseños experimentales) e incubadas por 7 días a 28 °C. Los productos obtenidos se trataron para la obtención de harinas (apartado 8.1.2) y se determinó la concentración de xantofilas (apartado 8.2.4).

8.3. MÉTODOS MATEMÁTICOS.

8.3.1. Modelo cinético de crecimiento y formación de producto.

Varios modelos matemáticos se han propuesto para analizar las cinéticas de crecimiento, la selección del modelo se realizó como función de los datos experimentales disponibles. En el presente trabajo se utilizó el modelo logístico de crecimiento desarrollado por Verhulst (1838) para estimar los parámetros cinéticos en fermentaciones batch para cada microorganismo, el modelo describe la relación entre el cambio en el crecimiento celular como función del tiempo en base a:

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{N_m} \right) \quad (1)$$

y la formación de producto se describe con el modelo propuesto por Leudeking-Piret (1959) que establece la relación entre la formación de producto como función del tiempo asociada al crecimiento en base a:

$$\frac{dE}{dt} = \alpha \left(\frac{dN}{dt} \right) + \beta N \quad (2)$$

Resolviendo las ecuaciones 1 y 2 (con $N = N_0$ y $E = E_0$ a una $t = 0$), la expresión que modela la producción de enzima es:

$$E - E_0 = \beta \left[N_m t + \frac{N_m}{\mu} \ln \left(\frac{N_0}{N_m} - \left(\frac{N_0}{N_m} - 1 \right) l^{-\mu t} \right) \right] + \alpha (N - N_0) \quad (3)$$

donde

$$N = \frac{N_0}{\frac{N_0}{N_m} - \left(\frac{N_0}{N_m} - 1 \right) l^{-\mu t}} \quad (4)$$

Los parámetros α y β se calcularon a partir de datos experimentales, usando optimización no lineal por medio de mínimos cuadrados y los métodos de Levenberg – Marquardt, donde E es la concentración de la enzima, N es la biomasa, N_m es la cantidad máxima de biomasa producida, μ es la constante de velocidad específica de crecimiento, los coeficientes α y β determinan si la producción del metabolito está ($\beta = 0$) o no ($\alpha = 0$) asociada al crecimiento y la concentración de la enzima (E) se evaluó como $(V_0 - V / V_0 - V_f)$, donde V_0 es la viscosidad inicial, V es la viscosidad como función del tiempo y V_f es la viscosidad final al tiempo infinito.

8.4. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES.

8.4.1. Estrategia para la optimización de variables.

La optimización de parámetros se realizó usando la metodología de superficie de respuesta. Esta técnica consiste en el análisis de variables en regiones experimentales definidas por los valores seleccionados para cada variable, la cuantificación de variables se realizó con base al análisis de varianza, la construcción de modelos matemáticos con base al algoritmo de mínimos cuadrados, el análisis de los modelos matemáticos propuestos, la búsqueda de regiones óptimas a través del camino de etapa ascendente y la caracterización del punto estacionario que maximiza la variable de respuesta (apéndice IV). Todas las estrategias experimentales se definieron con los valores codificados para las variables, -1 para el nivel bajo, +1 para el nivel alto y 0 para el valor intermedio (Montgomery, 1997).

8.4.2. Diseño de mezcla para análisis de microorganismos y actividad enzimática.

Se elaboraron esquemas experimentales donde los factores (x_i) fueron los componentes (microorganismo o extracto enzimático) de una mezcla, y en consecuencia, los niveles no son independientes, esto es:

$$x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_p = 1 \text{ (100\%)} \text{ para } 0 \leq x_i \leq 1 \text{ donde } i = 1,2,3, \dots,p.$$

La estrategia implicó ensayos con componentes puros y mezclas entre componentes. El análisis de los microorganismos se realizó con base a la eficiencia del ensilado (apartado

8.2.14) y la actividad enzimática se evaluó con relación a la disminución de la viscosidad de soluciones de CMC (apartado 8.2.10).

8.4.3. Optimización del inóculo

Tomando como base la metodología de superficie de respuesta (apéndice IV), se elaboraron esquemas experimentales secuenciales. El primer esquema consistió en un diseño de mezcla tipo “*escrutinio*” que contempla, al menos una combinación de microorganismos. Los resultados se expresaron por un modelo matemático construido por mínimos cuadrados y se usó para predecir cuales microorganismos presentan actividad significativa en el proceso de ensilado (apartado 8.4.2). Con base a los resultados del *escrutinio* se elaboró un esquema experimental de *centroide simplex* para x_i componentes y $2^x - 1$ ensayos, correspondientes a las x_i permutaciones. Se adicionaron ensayos al centro de la región experimental para estimar el error experimental y adecuación del modelo matemático. Los resultados permitieron definir la mezcla óptima del proceso de ensilado. El mismo esquema experimental de *centroide simplex* se desarrolló para los estudios de actividad enzimática.

8.4.4. Modelos matemáticos para diseños de mezcla

Los términos de orden mayor son frecuentemente necesarios en el modelo de mezcla debido a la constante de restricción $\sum x_i = 1$. Además, los complejos fenómenos que requieren descripciones que abarcan grandes regiones experimentales a menudo necesitan de modelos muy elaborados. Aún así, los términos involucrados en estos modelos tienen interpretaciones relativamente simples. Los términos lineales describen la respuesta esperada para cultivos puros ($x_i = 1$ y $x_j = 0, j \neq i$), así como la porción lineal de la mezcla. Cuando se encuentra una curvatura, parte no lineal entre pares de componentes (términos cuadráticos), los términos representan tanto efectos de sinergismo o antagonismo determinados por sus signos.

8.4.5. Estrategia experimental en fermentación de fase sólida.

Se estudiaron y evaluaron los parámetros críticos de operación y las interacciones significativas usando estrategias experimentales secuenciales con base a diseños factoriales.

Las variables consideradas fueron; A: contenido de humedad en el sistema, B: tiempo del intervalo de agitación, C: aireación al sistema y D: proporción de flor de cempoalxochitl-inóculo. Los factores primero, tercero y cuarto están relacionados al crecimiento microbiano, producción de metabolitos y la transformación de sustratos, el segundo y el tercero son factores importantes para determinar los requerimientos de calor efectivo y transferencia de masa, y el tercer factor se evaluó debido a que el proceso de ensilado se realiza en dos etapas. La primera etapa se caracteriza o se considera una fermentación de tipo aeróbica, donde el crecimiento de microorganismos está limitado a aquellos que utilizan el oxígeno intrapartícula. Los sistemas de ensilado que tienen un sellado y empacado perfectos, la fermentación aeróbica sólo dura unas cuantas horas. En la segunda etapa se establecen las condiciones anaeróbicas y por consiguiente crecen las bacterias anaerobias que producen ácido láctico. Definidas las variables, se construyó un esquema experimental factorial fraccionado a dos niveles (2^{4-1}) (A: 70 – 85%, B: 12 – 24 horas, C: 2 – 6 litros por minuto y D: 900 – 1200 g de flor de cempoalxochitl fresca). En todos los ensayos se fijaron constantes la concentración de inóculo inicial (7.5 g/l), la temperatura (28° C) y el tiempo de cada ensayo (7 días), y el pH aleatorio. Se adicionaron ensayos al centro de la región experimental (niveles medios de las variables) para estimar el error experimental, verificar interacciones entre variables y verificar efectos cuadráticos.

8.4.6. Optimización de variables en fermentación de fase sólida.

Con base a los resultados del diseño factorial fraccionado, se construyeron modelos matemáticos de primer orden con mínimos cuadrados, se evaluaron y usaron para explorar nuevas regiones experimentales (apéndice IV). La metodología se realizó hasta encontrar evidencias de curvatura. Finalmente, para optimizar los niveles de las variables independientes que maximizan la variable dependiente, se construyó un diseño experimental para ajustar modelos de segundo orden con características de rotabilidad, característica importante en la elección de un diseño de superficie de respuesta que estima la respuesta en todas las direcciones igualmente precisas.

8.4.7. Estrategia experimental para la obtención de datos de equilibrio y el prediseño de procesos.

Cuatro elementos se deben establecer en el diseño de procesos que están basados en mecanismos de difusión: el número de etapas de equilibrio o su equivalente, el tiempo de contacto requerido entre las fases, la velocidad de flujo permisible y los requerimientos de energía (Treybal, 1987; Geankoplis, 1993). Las variables de proceso involucradas son: (A) peso de la muestra de harina, (B) volumen de solvente, (C) temperatura de extracción y (D) tiempo de extracción. Las primeras dos variables se relacionan con la velocidad de flujo permisible, los cuatro factores se relacionan con el tiempo de contacto y la tercera define (indirectamente) los requerimientos de energía. Se realizó un diseño experimental factorial fraccional (dividido en dos partes) para dos niveles de cada variable (A: 1.0 y 2.0 g, B: 100 y 200 mL, C: 30 y 40° C, D: 5.0 y 10.0 min). Bajo este esquema se incluyeron tres ensayos experimentales correspondientes a los niveles intermedios de las variables para estimar el error experimental, verificar interacciones entre variables y verificar efectos cuadráticos.

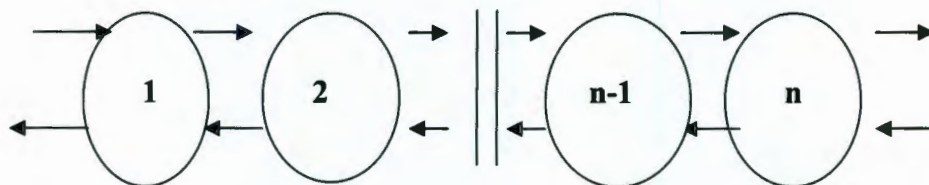
Los resultados se usaron como base para predecir los niveles que incrementan la respuesta (apéndice IV). Usando esta predicción, se construyó un segundo diseño experimental con características de rotabilidad y ajustar modelos de segundo orden para caracterizar superficies de respuesta.

8.4.8. Extracción de xantofilas a contracorriente; Sistema de Shanks.

El diseño de procesos de separación, basados en mecanismos difusionales, requiere del conocimiento del comportamiento de la distribución de la masa en dos fases inmiscibles cuando se alcanza el equilibrio. Una extracción eficiente de xantofilas sólo puede ser alcanzada usando operaciones de contacto múltiple. Con base a ello, se examinó la viabilidad de extracción de las harinas obtenidas del proceso optimizado de fermentación en estado sólido, se utilizó el sistema de Shanks para simular la extracción a contracorriente (Figura 8.3) donde la solución más concentrada entró en contacto con el sólido por lixiviar fresco y el solvente fresco se adicionó al sólido que más veces a sido lixiviado. El sistema puede operar con cualquier número de etapas. El objetivo fue incrementar la transferencia de masa, en mayor proporción que la que puede ser alcanzada por una extracción simple, y obtener altas concentraciones de producto en el extracto.

Solvente

Extracto



Sólido lixiviado

Sólido a lixiviar

Figura 8.3. Representación del sistema de múltiples etapas a contracorriente (sistema de Shanks).

8.4.9. Especificación de la variable de respuesta o dependiente.

En todo este trabajo se realizaron estudios para incrementar la concentración de xantofilas en harinas de flor del cempoalxochitl. La extracción está en función, con frecuencia, del tratamiento anterior que se le pueda dar a la materia prima. Con base a ello, la variable de respuesta en todos los casos fue la concentración de xantofilas totales en harinas (g de xantofilas / Kg de harina) en base seca.

8.4.10. Análisis Estadístico.

En todos los análisis de variables y modelos matemáticos se usaron los procedimientos del análisis de varianza (ANOVA) con valores de distribución de probabilidad para el análisis de datos con 0.05 de confiabilidad (software Statgraphics plus V 2.1., Manulogistics, Inc. Rockville, Md., U.S.A.).

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

9.1. ANÁLISIS DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL CEMPOALXOCHITL.

9.1.1. Microorganismos.

El análisis macro y microscópico del desarrollo microbiano en las muestras incubadas utilizando la técnica de traslado directo de partes de flor fresca, del ensilado en el laboratorio y muestras ensiladas en el proceso industrial, mostraron diversas formas y tipos de desarrollo microbiano, dentro de los cuales se distinguieron tres con características diferentes: (1) flora mixta de bacterias, (2) hongo filamentoso y (3) hongo de colonia extendida, color blanco y aspecto cremoso (Figura 9.1).

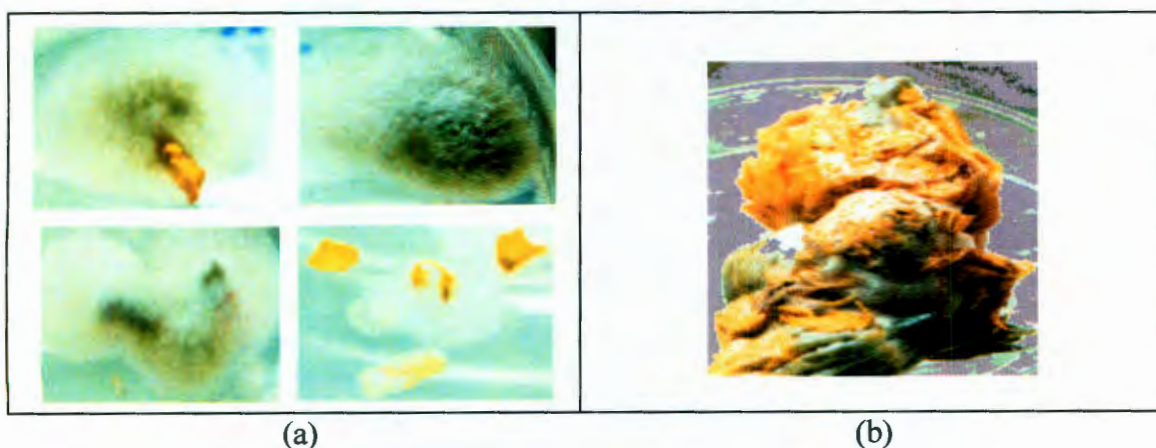


Figura 9.1. Desarrollo de la flora natural de flor de cempoalxochitl:(a) fresca (b) fermentada.

9.1.1.1. Análisis de bacterias.

Los análisis macro y microscópicos del consorcio de bacterias mostraron cinco cepas diferentes (Figura 9.2). Las bacterias aisladas fueron sembradas en tubo inclinado conteniendo agar nutritivo e incubados hasta su identificación.

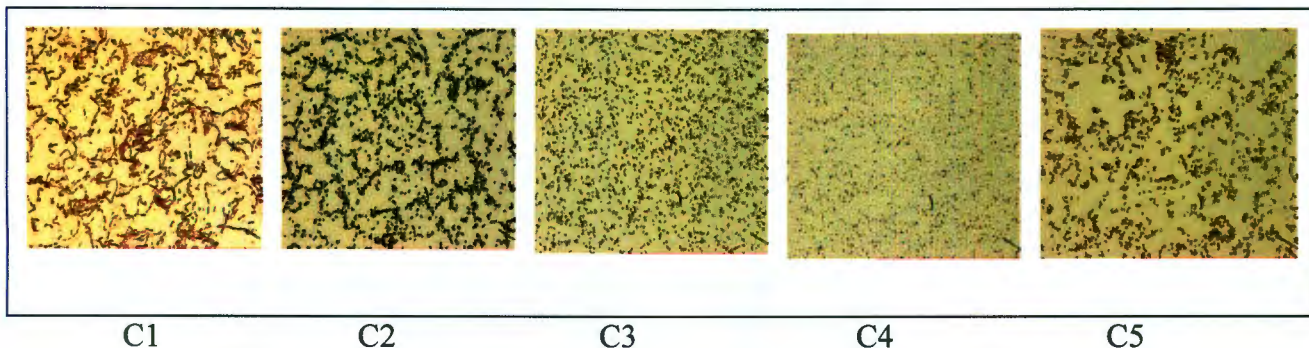


Figura 9.2. Características microscópicas de cinco bacterias aisladas como cultivos puros.

9.1.1.2. Identificación de bacterias.

Para la identificación de las colonias de bacterias aisladas se utilizaron los resultados en conjunto de las pruebas bioquímicas: Sistema API 20E, esquema de Pickett, esquema de Weaver-Hollis, Vittek y sistema para bacilos fermentadores (apendice I).

El análisis en conjunto de los resultados de éstas pruebas bioquímicas con base al índice y/o el programa informático, reveló, para una confiabilidad del 90%, que los microorganismos aislados son:

<i>Clave</i>	<i>Nombre</i>
C1	<i>Flavobacterium Iib.</i>
C2	<i>Acinetobacter anitratus.</i>
C3	<i>Enterobacter intermedius</i>
C4	<i>Enterobacter aerogenes</i>
C5	<i>Enterobacter agglomerans</i>

9.1.1.3. Análisis e identificación de hongos

Los análisis macro y microscópicos para los dos tipos de hongos mostraron:
Hongo (H1).

Crecimiento rápido en el medio de cultivo sólido, el área de siembra se llena por completo de densas masas de micelio aéreo de color gris, que cambia a gris pardo a medida que envejecen con la aparición de esporas (Figura 9.3). La parte vegetativa es de coloración blanca que tiende a oscurecerse en los cultivos viejos. Presenta hifas no septadas, estructuras reproductoras (esporas) asexuales de tipo esporangiosporas, los esporangios son grandes, globosos y de color negro que nacen de los puntos de unión de los rizoides y se proyectan hasta el extremo engrosado (columella) dentro del esporangio (Figura 9.3).

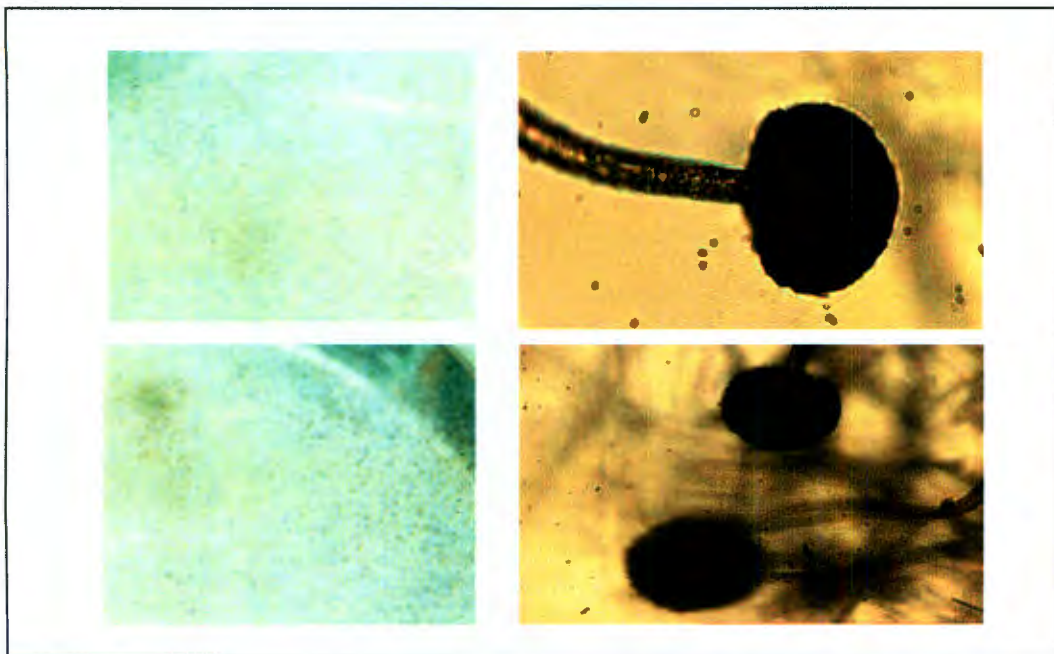


Figura 9.3. Observaciones macro y microscópicas del hongo H1.

Hongo (H2):

En las primeras etapas de desarrollo, éste hongo extiende su masa celular sobre la superficie plana del medio de cultivo. Las colonias desarrolladas son de gran extensión, de coloración blanca y consistencia cremosa. En la primera fase de crecimiento, presenta un aspecto de masa compacta que después se vuelve blanda y cremosa. A medida que envejece, se observaron cambios en la apariencia al presentarse formas rugosas y el matiz

se vuelve color crema (Figura 9.4). Presenta hifas septadas, estructura ramificada de tipo dicotómico, esporas asexuales de tipo artrosporas que al fragmentarse el micelio se liberan, cuando se desarrollan son de coloración gris parduzco, presentan dos formas (rectangular y oval) que depende de la edad del cultivo. La forma rectangular se observa cuando el cultivo es joven y el micelio crece sumergido y la forma oval se observa cuando el micelio se desarrolla aéreo y el cultivo es viejo (mayor de 72 hrs) (Figura 9.4).

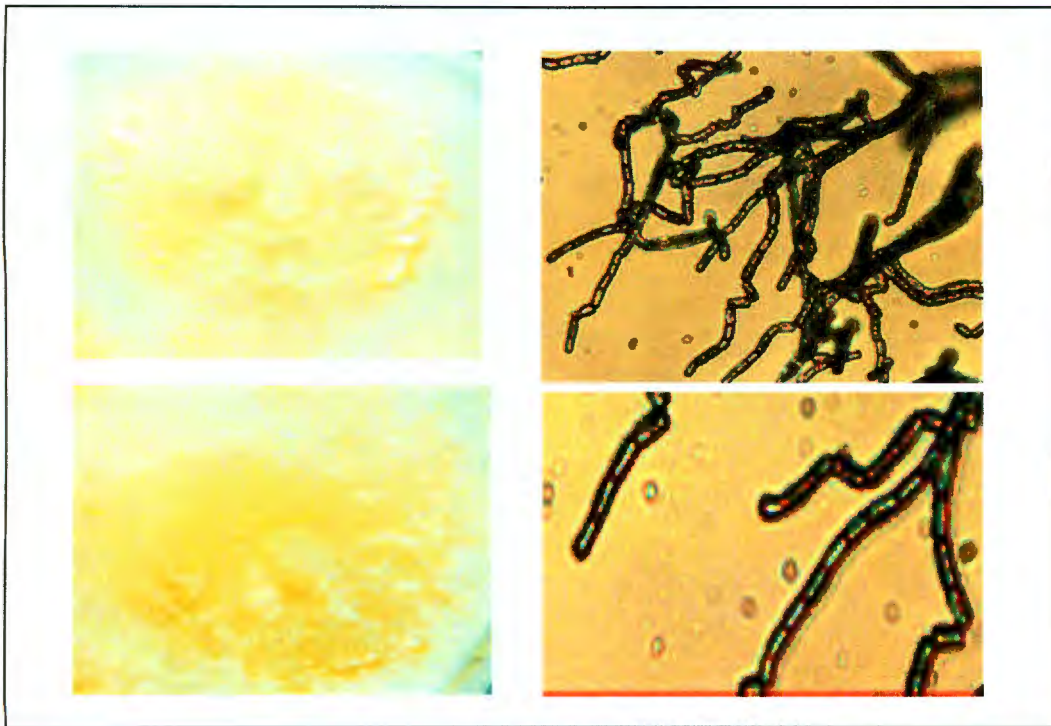


Figura 9.4. Observaciones macro y microscópicas del hongo H2.

El análisis realizado para ambos hongos comparado con el análisis microscópico reportadas en la literatura, muestran que los hongos aislados pertenecen al género *Rhizopus nigricans* (H1), *Geotrichum candidum* (H2).

9.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA BIOLÓGICO.

9.2.1. Estudios cinéticos, crecimiento y actividad enzimática.

El análisis cualitativo del cambio en la viscosidad observado en las soluciones de CMC después de añadirle extracto crudo enzimático (ϵ) mostró que solo las bacterias *Flavobacterium Iib* (C_1), y *A. anitratus* (C_2), y el hongo *Rhizopus nigricans* (H_1), presentaron una actividad enzimática significativa de celulasa (Figura 9.5).

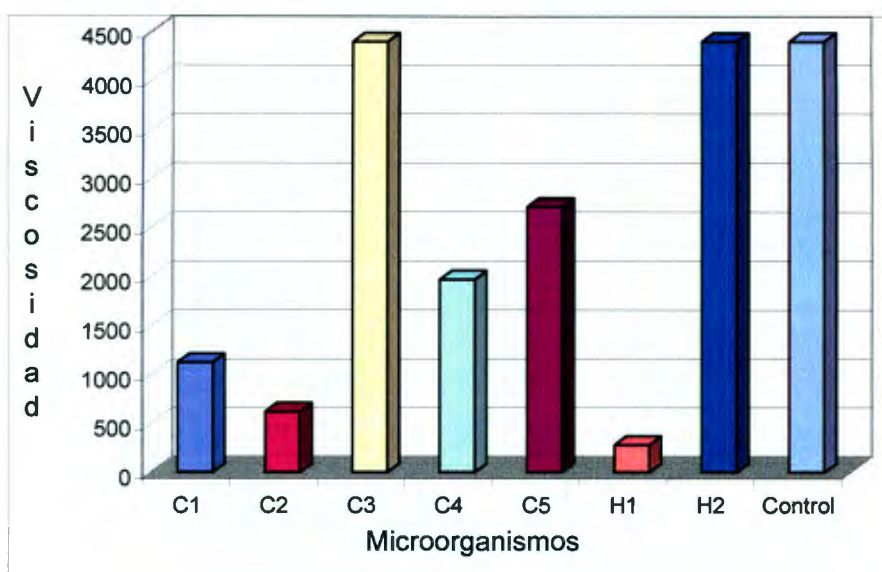


Figura 9.5. Cambios en la viscosidad de soluciones de CMC por efecto del extracto crudo enzimático (ϵ).

El análisis de la dependencia de la concentración de la enzima sobre la velocidad de crecimiento reveló que la mayor actividad enzimática ocurrió a las 16, 23 y 26 horas de tiempo de propagación para *Flavobacterium Iib* (C_1), *A. anitratus* (C_2), y *Rhizopus nigricans* (H_1), respectivamente (Figura 9.6). La actividad enzimática a estos tiempos de propagación mostró una reducción máxima en la viscosidad de la solución de CMC de 77.3, 88.6 y 93.6% para el extracto crudo de celulasa (ϵ) de *Flavobacterium Iib* (C_1), *Acinetobacter anitratus* (C_2), y *Rhizopus nigricans* (H_1), respectivamente.

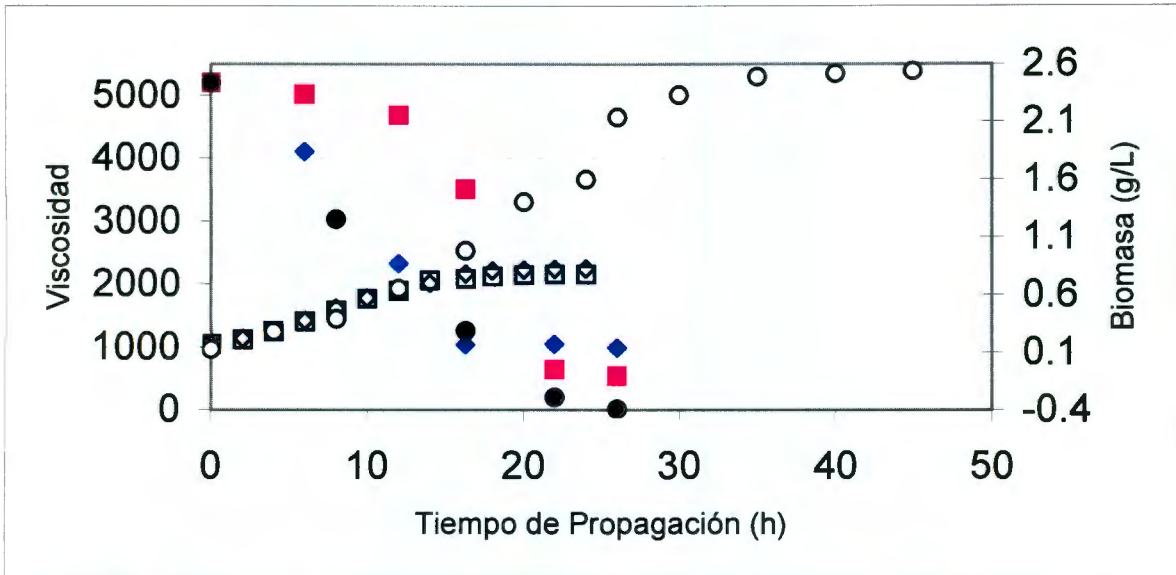


Figura 9.6. Cinéticas de crecimiento y síntesis de celulosa en cultivos por lote. Los símbolos claros indican la concentración celular en peso seco (eje derecho) para *Flavobacterium Iib* (◇), *Acinetobacter anitratus* (□) and *Rhizopus nigricans* (○). Los símbolos oscuros indican los cambios en la viscosidad asociada a la síntesis de celulosa (eje izquierdo) para *Flavobacterium Iib* (◆), *Acinetobacter anitratus* (■), y *Rhizopus nigricans* (●).

La aplicación del modelo logístico a los datos permitió determinar μ , que se usó para describir α y β utilizando los métodos de mínimos cuadrados y Leverberg – Marquardt. El análisis (modelo de Leudeking-Piret) de dependencia de la concentración de la enzima y la velocidad de crecimiento durante las fermentaciones en lote, mostraron que el parámetro β se acercó mucho a cero para *Flavobacterium Iib* (C_1) y *Rhizopus nigricans* (H_1), indicando esto que la producción de enzima para estos microorganismos está asociada al crecimiento de la biomasa. El parámetro α se acercó a cero para *A. anitratus* (C_2); por lo tanto, la producción de enzima de este microorganismo no está asociada con el crecimiento de la biomasa (Cuadro 9.1 y Figura 9.7).

Cuadro 9.1. Parámetros característicos de la ecuación de Leudeking-Piret a partir de datos experimentales.

	Microorganismos		
	C ₁	C ₂	H ₁
N_0 (g/L)	0.178	0.170	0.110
N_m (g/L)	0.82	0.80	2.50
μ (h ⁻¹)	0.257	0.287	0.157
(R^2)	0.99	0.99	0.99
α	0.801	0.0	0.594
β	0.036	0.998	0.993
(R^2)	0.99	0.99	0.99

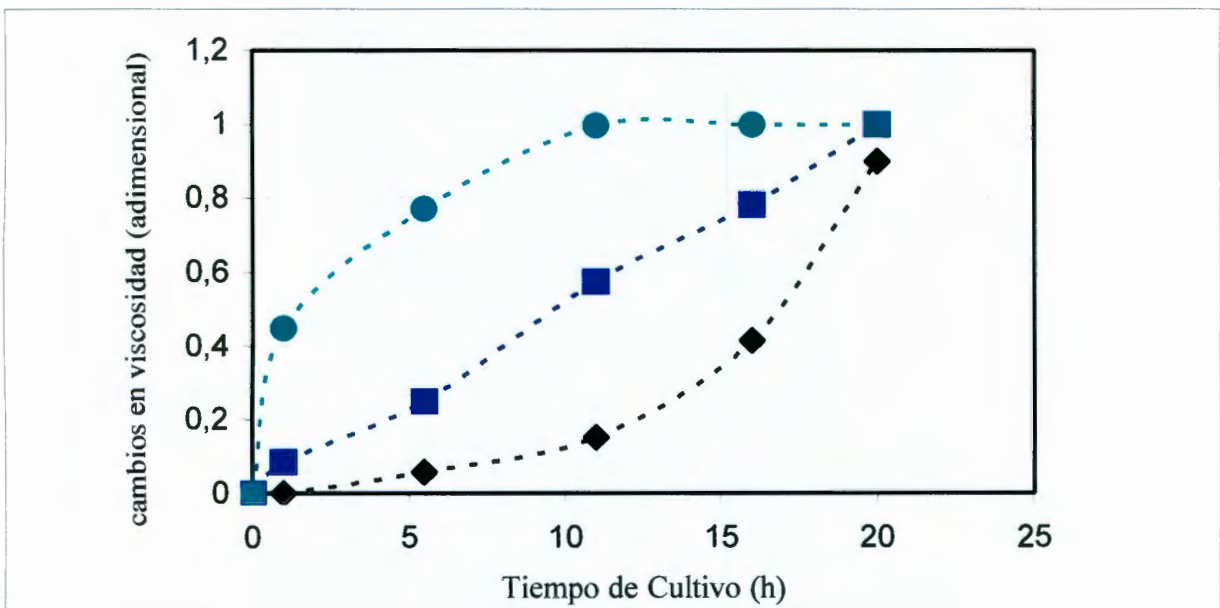


Figura 9.7. Cambios de viscosidad como función del tiempo de cultivo. Se usó regresión lineal para cada grupo de datos y se determinó si la producción de metabolitos es asociada [($\beta \rightarrow 0$) para *Flavobacterium IIb* (◆) y *Rhizopus nigricans* (●)] o no [($\alpha \rightarrow 0$) para *Acinetobacter anitratus* (■)] con el crecimiento.

9.2.2. Efectos Simbióticos o Antagónicos. Diseños de Cultivo Mixto.

En el análisis previo, los experimentos se llevaron a cabo usando extracto crudo de enzimas (ϵ) para cultivos simples. Para explorar la existencia de relaciones simbióticas o antagónicas entre los diferentes microorganismos con respecto a su producción de enzima, se construyó un diseño de centroide simplex usando extracto enzimático crudo (ϵ) para los tres microorganismos que mostraron la mayor actividad enzimática [*Flavobacterium Iib* (C_1), *A. anitratus* (C_2) y *Rhizopus nigricans* (H_1)]. Una vez más, se evaluó la actividad enzimática en cada experimento como función del cambio de viscosidad en una solución de CMC. Los resultados se muestran en la última columna del cuadro 9.2 y presenta la viscosidad final observada en cada experimento para cada ensayo del diseño.

Cuadro 9.2 Diseño de mezclas para extractos enzimáticos de microorganismos con mayor actividad celulolítica.

Ensayo/mezcla	ϵ_{C_1}	ϵ_{C_2}	ϵ_{H_1}	Viscosidad (cp)
1	1.0	0.0	0.0	340
2	0.0	1.0	0.0	190
3	0.0	0.0	1.0	10
4	0.5	0.5	0.0	490
5	0.5	0.0	0.5	40
6	0.0	0.5	0.5	50
7	0.333	0.333	0.333	75

El análisis de los datos sugiere un modelo cúbico especial (el ajuste se alcanzó usando mínimos cuadrados):

$$[\eta] = 340\epsilon_{C_1} + 190\epsilon_{C_2} + 10\epsilon_{H_1} + 900\epsilon_{C_1C_2} - 540\epsilon_{C_2H_1} - 3315\epsilon_{C_1C_2H_1}$$

En este modelo, el coeficiente para el extracto crudo de enzima de H_1 (ϵ_{H_1}) es significativamente diferente que el de los otros términos, indicando que el extracto enzimático de este microorganismo es más efectivo para lograr la degradación de CMC. El

coeficiente del término no lineal que incluye a C_1C_2 es positivo, lo que indicó que la mezcla de ambos extractos tiene un efecto sinérgico. Aún así, los resultados que se presentan en el cuadro 9.2 y en la figura 9.8, indican que una mezcla de extractos enzimáticos crudos de C_1 y C_2 no reducen significativamente la viscosidad como lo hacen los extractos de cada microorganismo por separado. Todos los coeficientes no lineales restantes son negativos, indicando que tienen interacciones antagónicas. De los resultados que se presentan en el cuadro 9.2 y la figura 9.8, se concluyó también que el extracto enzimático proveniente de H_1 presenta la mayor actividad enzimática al reducir más significativamente la viscosidad de la solución de CMC.

El modelo se representó gráficamente en la figura 9.8. La localización del óptimo se computó con precisión con técnicas estándar de optimización con restricciones basadas en el método de Newton – Raphsón (Press y col. 1996). Las restricciones fueron (con base al apartado 7.4.2):

$$\begin{aligned} 0 &\leq \varepsilon_{C_1} \leq 1.0 \\ 0 &\leq \varepsilon_{C_2} \leq 1.0 \\ 0 &\leq \varepsilon_{H_1} \leq 1.0 \\ \varepsilon_{C_1} + \varepsilon_{C_2} + \varepsilon_{H_1} &= 1.0 \end{aligned}$$

La solución del sistema da una composición óptima de extracto enzimático crudo: $\varepsilon_{C_1} = 0.19$, $\varepsilon_{C_2} = 0.13$ y $\varepsilon_{H_1} = 0.68$. Un extracto con esta composición maximizará la actividad de la celulasa, medida por medio de la reducción en la viscosidad de la solución de CMC de referencia.

9.2.3. Ensayos de ensilado: diseño de mezcla “escrutinio”.

Los resultados previos muestran que sólo tres de los microorganismos originalmente aislados tienen una actividad enzimática significativa. Sin embargo, al final, la recuperación de xantofilas totales es lo importante, por lo que se realizó un estudio de escrutinio en el ensilado usando los siete microorganismos aislados en un diseño de mezcla (Cuadro 9.3). Este estudio validó los resultados de actividad enzimática, usando la extracción de xantofilas totales (X_t) de los productos del ensilado como la variable de respuesta.

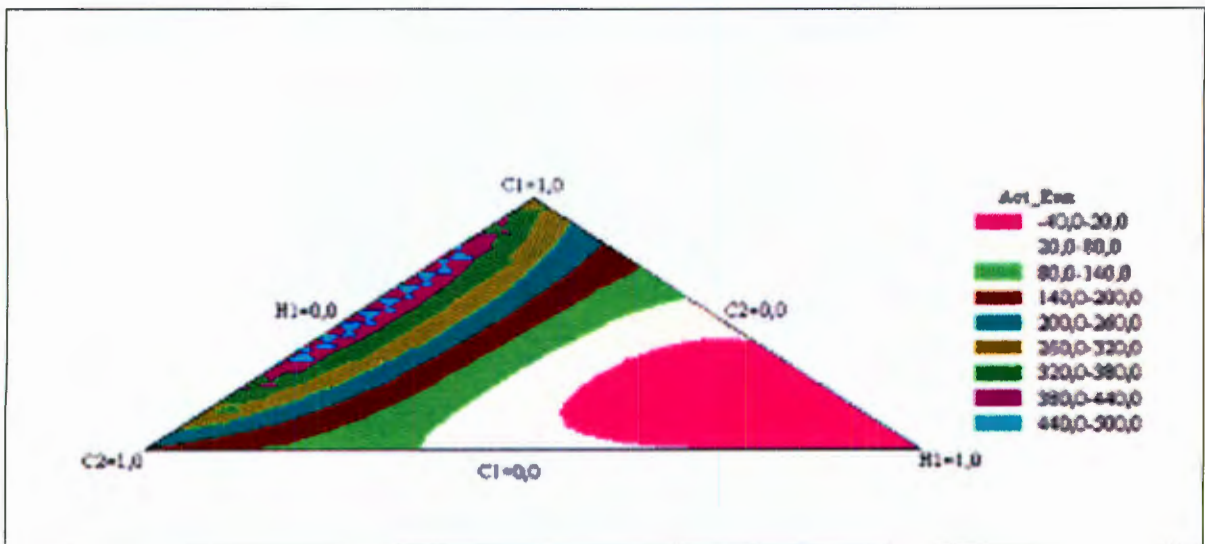


Figura 9.8. Contornos de superficie de respuesta estimada a partir del modelo de orden cúbico especial. La menor viscosidad se alcanza cuando el extracto mixto es compuesto por $C_1 = 0.19$; $C_2 = 0.13$ y $H_1 = 0.67$.

Cuadro 9.3. Diseño de mezclas tipo “escrutinio” para todos los microorganismos de interés en la extracción de xantofilas totales.

Ensayo/mezcl	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	H ₁	H ₂	[Xt] _F
a								
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.97
1	1.0							19.13
2		1.0						14.29
3			1.0					13.03
4				1.0				15.31
5					1.0			15.69
6						1.0		14.93
7							1.0	13.67
8	0	0.25	0	0.25	0.25	0.25	0	21.33
9	0	0	0.25	0	0.25	0.25	0.25	15.43
10	0.25	0	0	0.25	0	0.25	0.25	15.06
11	0	0.334	0	0	0.333	0	0.333	13.03
12	0	0	0.5	0	0	0.5	0	17.46
13	0	0	0	0.5	0	0.5	0	16.50
14	0.5	0	0	0	0.5	0	0	15.91
15	0.333	0.333	0	0	0	0.334	0	14.39
16	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0	23.35
17	0	0.333	0.333	0.334	0	0	0	22.75
18	0.25	0	0.25	0.25	0.25	0	0	16.69
19	0.14	0.14	0.15	0.14	0.14	0.14	0.15	14.09
20	0.333	0	0	0.334	0.333	0	0	21.47
21	0.5	0.5	0	0	0	0	0	23.24
22	0.166	0.166	0.167	0.166	0.166	0	0.166	13.26
23	0.166	0.166	0.166	0.166	0.167	0.166	0	17.90
24	0.333	0.333	0.334	0	0	0	0	15.75

[Xt]_F = Concentración de xantofilas totales en harina (g de xantofilas totales / Kg de harina)

El análisis de los datos sugirió que una descripción de los resultados se obtiene al ajustarlos a un modelo de primer orden:

$$[X_t] = 19.86C_1 + 17.1277C_2 + 14.2044C_3 + 16.0312C_4 + 14.9451C_5 + 17.1917H_1 + 12.2842H_2$$

El análisis de varianza del modelo indica (Cuadro 9.4), para un valor de distribución de probabilidad (PV) de 0.1, que el modelo propuesto no es una buena representación de los datos.

Cuadro 9.4. Análisis de varianza para el diseño de mezclas tipo “escrutinio”.

Fuente de variación	S.C.	G.L.	C.M.	F-R.	P-V.
Modelo Lineal	53.76	6	8.96	1.04	0.43
Error	146.47	17	8.59		

S.C. = suma de cuadrados, G.L.= grados de libertad, C.M. = cuadrados medios, F-R. = relación de Fisher, P-V. = valor de distribución de probabilidad.

Aún así, el modelo se usó para explorar las contribuciones de los diferentes microorganismos sobre el rendimiento de la extracción. En éste, los coeficientes de regresión tienen el siguiente orden de magnitud: $C_1 > C_2 > H_1 > C_4 > C_5 > C_3 > H_2$. Por lo tanto, se sugiere que las bacterias C_1 , C_2 y C_4 , así como el hongo H_1 , son los principales responsables en incrementar el rendimiento de extracción de xantofilas. Por otro lado, también se observa que los valores máximos del rendimiento reportado (Cuadro 9.3) exhiben un incremento significativo cuando se comparan con el ensayo control. La importancia relativa de C_1 , C_2 , C_4 y H_1 se confirmó al observar la respuesta individual en los experimentos número 8 (C_2 , C_4 , C_5 , H_1 ; 25% de cada uno), 16 (C_1 , C_2 , C_3 , H_1 ; 25% de cada uno), 17 (C_2 , C_3 y C_4 ; 33% de cada uno), 20 (C_1 , C_4 y C_5 ; 33% de cada uno) y 21 (C_1 , C_2 ; 50% de cada uno), que contienen grandes proporciones de los cuatro microorganismos y presentan los valores de extracción de xantofilas totales más significativos.

Estas observaciones preliminares sentaron las bases para seleccionar un reducido número de microorganismos C_1 : *Flavobacterium I1b*, C_2 : *Acinetobacter anitratus*, C_4 :

Enterobacter aerogenes y H₁: *Rhizopus nigricans*, como los más significativos para extraer el máximo posible xantofilas después del proceso de ensilado de la flor de cempoalxochitl.

9.2.4. Optimización de cultivos mixtos en el ensilado de la flor del cempoalxochitl.

Se realizó un nuevo diseño de mezclas para los cuatro microorganismos seleccionados, y se estableció la composición del cultivo. Se construyó un diseño de *centroide simplex* que incluyó cultivos puros y las posibles combinaciones de los cuatro microorganismos. Se definió como la variable de respuesta a la concentración de xantofilas totales en el producto ensilado. El cuadro 9.5 presenta el diseño y la concentración de xantofilas alcanzada en cada experimento.

Para localizar el óptimo, los datos se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden:

$$[X_i] = 18.693 C_1 + 20.005 C_2 + 20.612 C_4 + 21.769 H_1 + 14.074 C_1C_2 + 10.999 C_1C_4 + 9.542 C_1H_1 - 13.886 C_2C_4 + 15.741 C_2H_1 + 6.796 C_4H_1$$

El análisis de varianza (Cuadro 9.6) muestra a este modelo como una buena representación de los datos para un valor de distribución de probabilidad (PV) igual a 0.05. En éste, se observa que los coeficientes de regresión de los términos lineales son muy similares, indicando que los cuatro microorganismos son necesarios para alcanzar rendimientos elevados. Por otro lado, ya que todos los términos no lineales son positivos, con excepción del coeficiente de C₂C₄, los cultivos mixtos mostrarán efectos sinérgicos favorables. La interacción C₂C₄ se puede caracterizar como antagónica.

Cuadro 9.5. Diseño de mezclas de *centroide simplex*.

Ensayo / mezcla	C ₁	C ₂	C ₄	H ₁	[Xt] _F
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	12.95
1	1.0	0.0	0.0	0.0	18.88
2	0.0	1.0	0.0	0.0	20.12
3	0.0	0.0	1.0	0.0	20.59
4	0.0	0.0	0.0	1.0	21.62
5	0.5	0.5	0.0	0.0	21.86
6	0.5	0.0	0.5	0.0	21.93
7	0.5	0.0	0.0	0.5	22.67
8	0.0	0.5	0.5	0.0	16.66
9	0.0	0.5	0.0	0.5	25.17
10	0.0	0.0	0.5	0.5	23.78
11	0.333	0.334	0.333	0.0	22.61
12	0.333	0.333	0.0	0.334	24.94
13	0.334	0.0	0.333	0.333	22.60
14	0.0	0.333	0.334	0.333	20.30
15	0.25	0.25	0.25	0.25	23.42

[Xt]_F = concentración de xantofilas totales en harina (g de xantofilas totales por Kg de harina de flor del cempoalxochitl)

Cuadro 9.6. Análisis de varianza para el modelo del diseño de *centroide simplex*.

Fuente de variación	S.C.	G.L.	C.M	F-R.	P-V.
Modelo	63.39	9	7.04	4.45	0.05
Error	7.92	5			

S.C. = suma de cuadrados, G.L.= grados de libertad, C.M. = cuadrados medios, F-R. = relación de Fisher, P-V. = valor de distribución de probabilidad.

El modelo se representó gráficamente en la figura 9.9 a-d. Esta representación muestra la existencia de un efecto antagonista evidente entre las bacterias C_2 y C_4 . Además, el máximo rendimiento de xantofilas se alcanza cuando la concentración de la bacteria C_4 tiende a cero (Figura 9.9 c – d). Este resultado, junto con el estudio de actividad enzimática previo, llevó a la exclusión de la bacteria C_4 del cultivo mixto óptimo para la extracción de xantofilas. Por lo tanto, el cultivo mixto óptimo debe contener sólo a los microorganismos C_1 : *Flavobacterium IIb*, C_2 : *Acinetobacter anitratus*, y H_1 : *Rhizopus nigricans* (Figura 9.9 a).

La localización del óptimo se computó con técnicas estándar de optimización con restricciones basadas en el método de Newton – Raphson (27). Las restricciones son (con base al apartado 7.4.2):

$$\begin{aligned}0 &\leq C_1 \leq 1.0 \\0 &\leq C_2 \leq 1.0 \\0 &\leq C_4 \leq 1.0 \\0 &\leq H_1 \leq 1.0 \\C_1 + C_2 + C_4 + H_1 &= 1.0\end{aligned}$$

La solución para este sistema da una concentración de inóculo óptimo estimada de ($C_1 = 0.098$; $C_2 = 0.41$; $C_4 = 0.0$ y $H_1 = 0.492$) y un rendimiento máximo para la extracción de xantofilas de aproximadamente 24.94 g/kg en peso seco (90% más que la corrida de control). Resultado similar al obtenido para los estudios de actividad enzimática. Además, son consistentes con los resultados que se reportaron previamente (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997), que demostraron incrementar el rendimiento de extracción cuando la flor de cempoalxochitl deshidratada se trató con una preparación de celulasas.

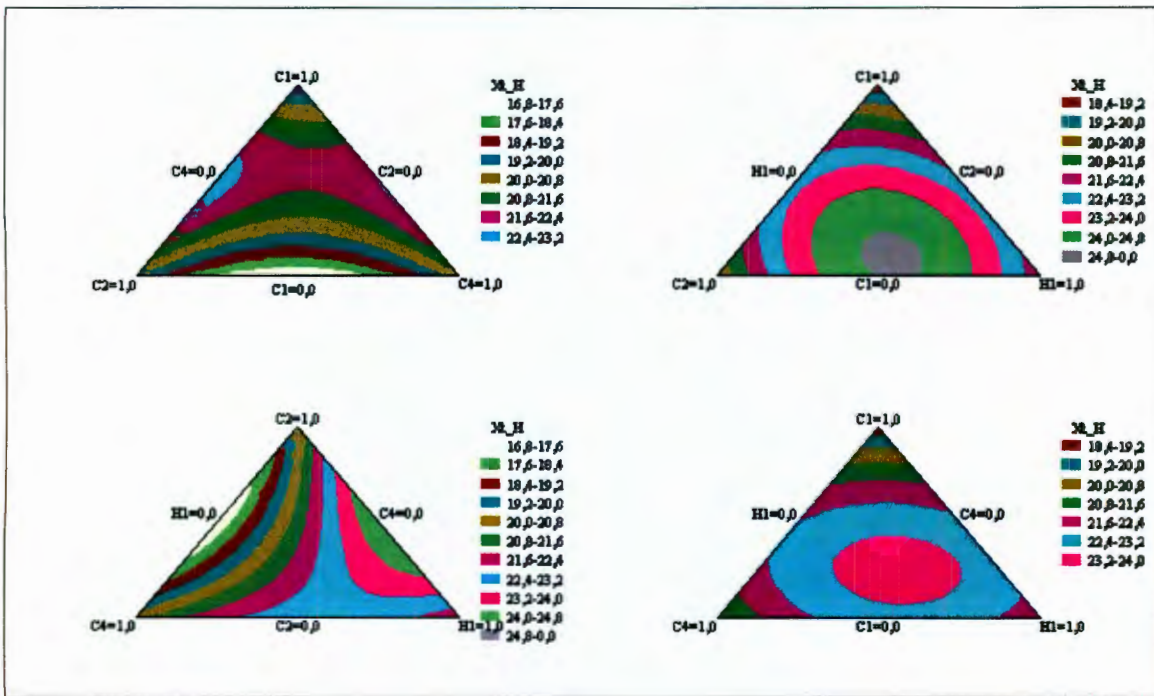


Figura 9.9. Contornos de superficie de respuesta estimada de la ecuación 9.3. Las figuras 9.8c y 9.8d indican un efecto antagónico entre C_2 : *Acinetobacter anitratus* y C_4 : *Enterobacter aerogenes*. La máxima extracción de xantofilas se alcanza cuando la concentración de la bacteria C_4 tiende a cero. La composición óptima del inoculo es $C_1 = 0.12$; $C_2 = 0.40$; $C_4 = 0.0$ y $H_1 = 0.48$.

9.2.5. CONCLUSIONES PARCIALES

Hasta aquí, se examinó la eficiencia del proceso de ensilado para la extracción de xantofilas de la flor de cempoalxochitl. Se aislaron e identificaron [*Flavobacterium Iib* (C₁), *Acinetobacter anitratus* (C₂), *Enterobacter intermedius* (C₃), *Enterobacter aerogenes* (C₄), *Enterobacter agglomerans* (C₅), *Rhizopus nigricans* (H₁) and *Geotrichum candidum* (H₂)] los microorganismos saprófitos asociados a la flor del cempoalxochitl que causan su pudrición (fermentación). Se estudió su actividad enzimática, en particular la producción de celulasa. Se concluyó que las bacterias *Flavobacterium Iib* y *Acinetobacter anitratus* y el hongo *Rhizopus nigricans* muestran una síntesis y excreción significativas de esta enzima, evaluada por la reducción en la viscosidad de soluciones de CMC. Estudios cinéticos de crecimiento y actividad enzimática permitieron definir los tiempos óptimos de propagación para cada microorganismo (16 h *Flavobacterium Iib*; 23 h *Acinetobacter anitratus* y 16 h *Rhizopus nigricans*). El análisis de los experimentos de actividad enzimática sugieren una composición de cultivo mixto dada por los siguientes valores: C₁: *Flavobacterium Iib* = 19%; C₂: *Acinetobacter anitratus* = 13% y H₂: *Rhizopus nigricans* = 68% como inóculo inicial. Los estudios de ensilado, basados en diseño de mezclas y la metodología de superficie de respuesta, revelaron que el inóculo compuesto de C₁: *Flavobacterium Iib* = 9.8%; C₂: *A. anitratus* = 41% y H₁: *Rhizopus nigricans* = 49.2% incremento de forma significativa la extracción de xantofilas totales (90% más que el control).

Los resultados de ambos estudios, actividad enzimática y ensilado, sugieren que el nivel de celulasa es el principal factor responsable de la degradación de los polímeros estructurales de las paredes celulares en los pétalos de la flor de cempoalxochitl, facilitando así la transferencia de masa e incrementando la extracción. Las diferencias entre los valores obtenidos para la composición óptima del inóculo en los estudios de actividad enzimática y del ensilado no se pueden explicar completamente por esta metodología experimental. Estas diferencias pueden ser el resultado de fenómenos de difusión o diferencias en la naturaleza química de las paredes celulares de la flor de cempoalxochitl (mezcla de polímeros de celulosa y hemicelulosa) cuando son comparados con un modelo de CMC. Tal vez otra actividad enzimática de los cultivos iniciales contribuye a la interacción entre el rendimiento de xantofilas y la acción de la celulasa. El estudio realizado muestra a los

diseños de mezclas y la metodología de superficie de respuesta como una herramienta útil para evaluar consorcios de microorganismos con base a su actividad enzimática.

9.3. Especificación y características del sistema biológico a utilizar para la fermentación de la flor del cempoalxochitl.

Con base en los resultados de los estudios cinéticos (crecimiento y actividad enzimática) se definieron los tiempos de propagación para los microorganismos (16 h *Flavobacterium I1b*; 23 h *Acinetobacter anitratus* y 26 h *Rhizopus nigricans*) que presentan mayor incidencia en el ensilado de la flor y de los estudios de ensilado se determinó la composición del inoculo (*Flavobacterium I1b* = 9.8%; *Acinetobacter anitratus* = 41% y *Rhizopus nigricans* = 49.2%). Por lo tanto, la preparación del inóculo se realizó al propagar, de manera independiente, en caldo nutritivo las bacterias y caldo papa dextrosa para el hongo en un agitador incubador orbital (forma scientific modelo 4520) a 28 °C, 180 rpm durante 16, 23 y 16 horas (para *Flavobacterium I1b*, *Acinetobacter anitratus* y *Rhizopus nigricans* respectivamente). Mezclados en proporción del 9.8% de *Flavobacterium I1b*, 41% de *Acinetobacter anitratus* y 49.2% de *Rhizopus nigricans*. Condiciones que permitieron alcanzar una concentración de celular de 7.5 g/L.

9.4. Fermentación en fase sólida.

A pesar de los resultados alentadores previos obtenidos, en el proceso de ensilado aún permanecen eventos sin comprender. En esta nueva contribución, se caracterizó y optimizó el ensilado de la flor del cempoalxochitl con enfoque de proceso de fermentación en fase sólida buscando incrementar los rendimientos de la extracción de xantofilas totales.

Para evaluar los parámetros críticos de operación e interacciones entre variables en fermentación sólida se realizaron los estudios experimentales descritos en el apartado 7.4.5. Los resultados (última columna del cuadro 9.7) del primer esquema experimental ($2^{4-1}+1C$) muestran, con base al análisis de varianza (Cuadro 9.8) y un intervalo de confianza de 0.05, a los factores principales A, B, C y D, así como las interacciones entre ellos $AB = CD$; $AC = BD$ y $BC = AD$ como significativos.

Cuadro 9.7. Resultados de experimentos realizados para el diseño $2^{4-1}+1C$.

Ensayo	A (Humedad)	B (Agitación)	C (Aireación)	D (flor)	Rendimiento de Xantofilas ^a
1	-1	+1	-1	+1	15.988
2	-1	-1	+1	+1	13.910
4	+1	-1	+1	-1	10.740
6	+1	+1	+1	+1	12.805
7	+1	-1	-1	+1	15.124
8	+1	+1	-1	-1	5.564
9	-1	-1	-1	-1	13.940
10	-1	+1	+1	-1	11.684
11	0	0	0	0	12.467

^a gramos de xantofilas /kilogramo de harina

Se utilizó el algoritmo de Yates para explicar el efecto de las interacciones que determinan el rendimiento de la extracción dentro del rango explorado en este primer conjunto de experimentos. Este análisis indicó que se logra el rendimiento más alto de xantofilas cuando las variables implicadas en el estudio (A,B,C,D) operan en su nivel bajo (A:70% de humedad, B: agitación cada 12 horas, C: 2 litros por minuto de aireación y D: 1200 g de flor fresca del cempoalxochitl).

El ensayo de comprobación mostró un incremento en el rendimiento de la extracción de xantofilas (15.13 g/kg de flor de cempoalxochitl fermentada) a estas condiciones. Por otro lado, del análisis de las interacciones AB, AC y BC se infiere que la interacción AB (humedad-agitación) es significativa debido a que es un mecanismo que mantiene una humedad homogénea en el lecho de sustrato, evita gradientes que pudieran limitar al crecimiento local de microorganismos y favorece la formación de aglomerados del sustrato. En este estudio, la interacción AB tuvo influencia en la formación de aglomerados que limitó el control de la temperatura dentro del sustrato, diferencias en el crecimiento de microorganismos y actividad metabólica. La interacción AC (humedad-aire) indica que aún cuando la aireación permite el suministrar oxígeno para el crecimiento del

microorganismo y eliminar el dióxido de carbono producto del metabolismo, también incrementó la transferencia de humedad entre las fases sólida y gaseosa. En este estudio, la interacción AC presentó dos efectos “negativos” relacionados a la remoción de calor y la desecación del sustrato. La interacción BC (agitación-aire) es significativa porque es el mecanismo que determinó el nivel del gradiente de temperatura, influye en el contenido de humedad en el lecho del sustrato y limita el crecimiento y actividad de los microorganismos.

Cuadro 9.8. Análisis de varianza para los resultados del diseño $2^{4-1} + 1C$.

Fuente de variación	S.C.	G.L.	P- V.
Efectos principales			
Factor A: Humedad	15.930	1	0.0004
Factor B: Agitación	7.3576	1	0.0006
Factor C: Aireación	0.2726	1	0.0029
Factor D: Flor	31.599	1	0.0003
AB + CD	6.6914	1	0.0006
AC + BD	6.4658	1	0.0006
AD + BC	6.7563	1	0.0006
Error	5.8E-6	1	
Total	75.073	8	

$R^2 = 99.9$; error estándar = 0.0024

S.C.: Suma de cuadrados; G.L. : Grados de libertad; P-V. : Distribución de probabilidad.

Combinando los resultados obtenidos con el algoritmo de Yates y las observaciones experimentales, se describió la relación que existe entre los factores principales A, B, C y D y las interacciones AB, AC y BC construyendo un modelo polinomial de regresión con mínimos cuadrados:

$$[X_t] = 12.469 - 1.41A - 0.959B - 0.185C + 1.987D - 0.914AB + 0.899AC + 0.919BC$$

donde las variables se especifican en sus unidades codificadas. La ecuación supone implícitamente que la dependencia de la variable de respuesta con respecto a los factores es lineal y que los efectos son aditivos. El análisis de varianza (Cuadro 9.9) mostró que el modelo es una buena aproximación geométrica de la función de respuesta en la región experimental explorada.

Cuadro 9.9. Análisis de varianza para el modelo de primer orden.

Fuente de variación	S.S.	D.F.	P. V.
Modelo	75.073	7	0.0006
Residual	5.8E-6	1	
Total	75.073	8	

$R^2 = 99.9$; error estándar = 0.0024

S.C.: Suma de cuadrados; G.L. : Grados de libertad; P-V. : Distribución de probabilidad.

Usando este modelo se buscó, vía el camino de la etapa ascendente, la nueva región experimental que mejoró los rendimientos de la extracción de xantofilas en la flor del cempoalxochitl sometida a fermentación (Cuadro 9.10). La estrategia propuesta sugirió que las condiciones; A: 71.98% de humedad, B: agitación cada 15.48 horas, C: 3.21 litros por minuto de aireación y D: 1215 g de flor de cempoalxochitl fresca (ensayo 11; Cuadro 9.10) permitió incrementar los valores en el rendimiento de la extracción.

Ensayos adicionales (después del ensayo 11) no fueron viables, porque la extracción de xantofilas disminuyó, por lo tanto, el nuevo esquema experimental para la optimización se construyó tomando como referencia los niveles de las variables alrededor del ensayo 11. El diseño fue un nuevo factorial fraccionado $2^{4-1}+1C$ para A: 65 – 75%, B: 12 – 18 horas, C: 1 – 4 litros por minuto y D: 1100 – 1400 g de flor de cempoalxochitl, (Cuadro 9.11).

Cuadro 9.10. Ensayos realizados con base al camino de la etapa ascendente.

Ensayos	Condiciones codificadas				Humedad (%)	Agitación (hr)	Aireación (lpm)	Flor (g)	Rendimiento de xantofilas ^a
	A	B	C	D					
9	0	0	0	0	77.5	18.0	4.0	1050.0	12.47
10	-0.37	-0.23	-0.1	0.55	74.7	16.61	3.75	1132.5	13.68
11	-0.74	-0.42	-0.4	1.1	71.98	15.48	3.21	1215.0	14.28
12	-1.15	-0.6	-0.8	1.65	68.89	14.42	2.39	1297.5	13.56
13	-1.63	-0.8	-1.4	2.2	65.28	13.29	1.26	1380.0	13.49

Cuadro 9.11. Resultados de experimentos realizados para el segundo diseño $2^{4-1}+1C$.

Ensayo	A (Humedad)	B (Agitación)	C (Aireación)	D (flor)	Rendimiento de Xantofilas ^a
14	-1	+1	-1	+1	8.53
15	-1	-1	+1	+1	12.51
16	+1	-1	+1	-1	14.51
17	+1	+1	+1	+1	17.43
18	+1	-1	-1	+1	14.22
19	+1	+1	-1	-1	8.67
20	-1	-1	-1	-1	13.45
21	-1	+1	+1	-1	15.18
22	0	0	0	0	13.11

^a gramos de xantofilas /kilogramo de harina

El análisis de los resultados, con base al análisis de varianza (Cuadro 9.12) y un intervalo de confianza de 0.05, mostró que solo los factores principales A, B, C y las interacciones AD y BD son significativas.

La interacción AD (Humedad-Flor) es significativa porque determina el contenido de humedad en el sustrato e implica la condición que favorece el crecimiento del microorganismo y la transformación del sustrato, que en fermentación de fase sólida constituye la variable crítica de actividad de agua. La interacción BD (Agitación-Flor) es significativa porque favorece la aglomeración de las partículas del sustrato y la inducción de esfuerzos de corte que limitan la actividad microbiana, sobretodo la colonización y actividad de *Rhizopus nigricans*.

Cuadro 9.12. Análisis de varianza para los resultados del segundo diseño $2^{4+1}+1C$

Fuente de variación	S.C.	G.L.	P- V.
Efectos principales			
Factor A: Humedad	3.3297	1	0.0128
Factor B: Agitación	2.9880	1	0.0135
Factor C: Aireación	27.266	1	0.0045
Factor D: Flor	0.0965	1	0.0747
AB + CD	0.0189	1	0.1656
AC + BD	1.3888	1	0.0198
AD + BC	32.252	1	0.0041
Error	0.0013	1	
Total	67.341	8	

$R^2 = 99.9$; error estándar = 0.036

S.C.: Suma de cuadrados; G.L. : Grados de libertad; P-V. : Distribución de probabilidad.

Se usó el algoritmo de Yates y se determinaron los niveles de las variables que incrementan los rendimientos de la extracción (A: 75% de humedad, B: agitación cada 12 horas, C: 4 litros por minuto de aireación y D: 1400 g de flor fresca de cempoalxochitl). El análisis se resume por medio de la construcción por mínimos cuadrados del modelo polinomial de regresión:

$$[X_t] = 13.0655 + 0.645A - 0.611B - 1.846C + 2.008AD + 0.416BD$$

donde, las variables se especifican en sus unidades codificadas. La ecuación supone implícitamente que la dependencia de la variable de respuesta con respecto a los factores es lineal y que los efectos son aditivos. El análisis de varianza (Cuadro 9.13) mostró que el modelo es una buena aproximación geométrica de la función de respuesta en la región experimental explorada.

Cuadro 9.13. Análisis de varianza del modelo de primer orden para los resultados del segundo diseño $2^{4-1} + C$.

Fuente de variación	S.C.	G.L.	P- V.
Modelo	67.2244	7	0.0002
Residual	0.1168	1	
Total	67.3412	8	

$R^2 = 99.5$; error estándar = 0.197

S.C.: Suma de cuadrados; G.L. : Grados de libertad; P-V. : Distribución de probabilidad.

Este modelo “refinado” permitió hacer una mejor extrapolación, a lo largo de la etapa ascendente, a la región donde la extracción de xantofilas se maximiza (Cuadro 9.14). En esta estrategia la variable D (cantidad de flor de cempoalxochitl) no significativa (Cuadro 9.12) se definió como constante con un valor dictaminado por su nivel intermedio (1250 g). La ruta de extrapolación mostró que los resultados del rendimiento exhiben solo pequeñas diferencias entre sí.

Cuadro 9.14. Ensayos realizados con base al camino de la etapa ascendente para el segundo modelo lineal.

Ensa- yos	Condiciones codificadas				Humedad (%)	Agitación (hr)	Aireación (lpm)	Flor (g)	Rendimiento de xantofilas ^a
	A	B	C	D					
22	0	0	0	0	70.0	15.0	2.5	1250.0	13.11
23	0.2	-0.18	0.55	0.0	71.0	14.43	3.35	1250.0	13.86
24	0.4	-0.32	0.99	0.0	72.0	13.86	4.21	1250.0	14.54
25	0.6	-0.41	1.33	0.0	73.0	13.29	5.07	1250.0	15.49
26	0.8	-0.47	1.59	0.0	74.0	12.73	5.93	1250.0	15.24
27	1.0	-0.52	1.8	0.0	75.0	12.16	6.79	1250.0	15.02

^a gramos de xantofilas /kilogramo de harina

La extrapolación sugirió las condiciones que dan el mejor rendimiento (corrida 25 Cuadro 9.14). Los ensayos adicionales no son viables ya que la extracción de xantofilas disminuyó. Es posible que la región del óptimo esté cerca y se localice el punto estacionario que maximiza el rendimiento. Para definir los valores óptimos de las variables se construyó un tercer esquema experimental, en este sólo se consideraron tres variables con valores limitados por la estrategia de extrapolación [A: humedad (70 – 75%), B: agitación (12 – 15 horas) y C: aireación (2.5 – 5 litros por minuto)]. Se seleccionó el esquema propuesto por Box-Behnken (1960) que posee características de rotabilidad deseable para ajustar superficies de respuesta (Cuadro 9.15).

Cuadro 9.15. Diseño de Box-Behnken y resultados de rendimiento.

Ensayo	A (Humedad)	B (Agitación)	C (Aireación)	Rendimiento de extracción ^a
28	-1	-1	0	15.11
29	-1	+1	0	15.84
30	+1	-1	0	12.98
31	+1	+1	0	17.30
32	-1	0	-1	11.42
33	-1	0	+1	15.21
34	+1	0	-1	13.50
35	+1	0	+1	16.96
36	0	-1	-1	10.38
37	0	-1	+1	12.98
38	0	+1	-1	14.50
39	0	+1	+1	17.03
40	0	0	0	17.46
41	0	0	0	17.32
42	0	0	0	17.57

^a gramos de xantofilas /kilogramo de harina

Los resultados de esta estrategia permiten describir el sistema al ajustar un modelo de segundo orden por medio de mínimos cuadrados y obtener una mejor precisión del óptimo.

$$[Xt] = 17.45 + 0.393 A + 1.652 B + 1.547 C - 0.794 A*A + 0.898 A*B - 0.082 A*C - 1.345 B*B - 0.017 B*C - 2.382 C*C$$

donde las variables se especifican en sus unidades codificadas. El modelo también se usó para construir gráficas de superficie de respuesta (Figuras 9-10 a-c) que definen el punto estacionario que maximiza el rendimiento de la extracción de xantofilas.

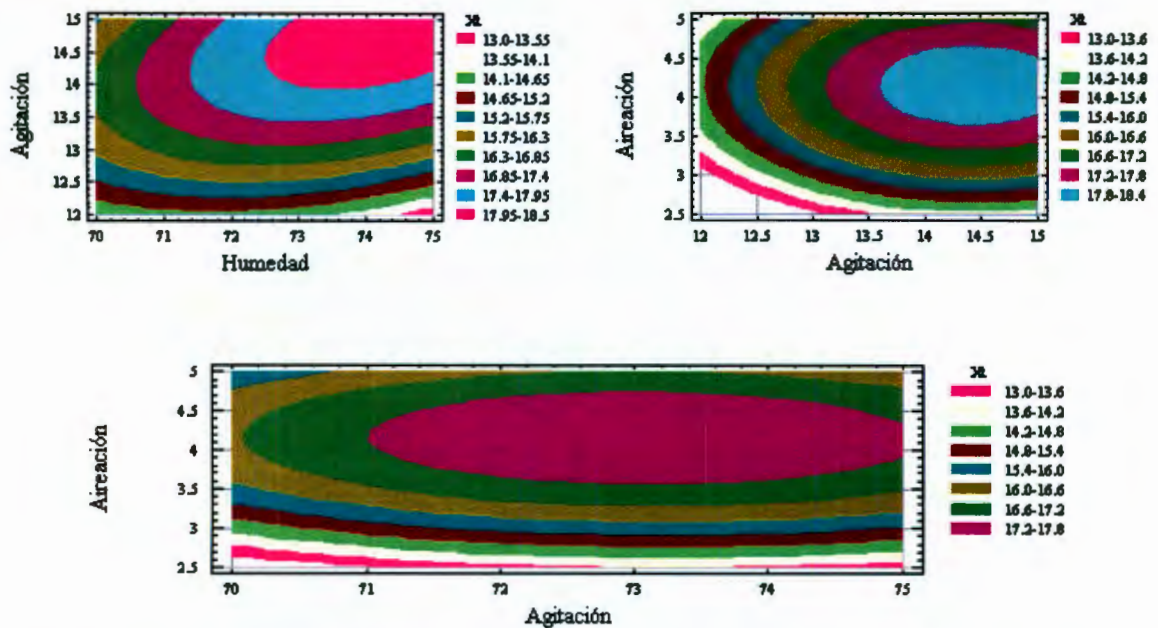


Figura 9.10. Contornos de respuesta estimada a partir del modelo de segundo orden. El máximo rendimiento de xantofilas se obtiene con los valores de convergencia: $A = 0.71$; $B = 0.85$ y $C = 0.31$.

La localización del óptimo se definió, para un sistema multidimensional, por la solución al sistema de ecuaciones lineales obtenidas al derivar el modelo de segundo orden:

$$\frac{\partial[X_t]}{\partial A} = 0.393 - (2)0.794A + 0.898B - 0.082C = 0$$

$$\frac{\partial[X_t]}{\partial B} = 1.652 + 0.898A - (2)1.345B - 0.017C = 0$$

$$\frac{\partial[X_t]}{\partial C} = 1.547 - 0.082A + 0.017B - (2)2.382C = 0$$

La solución del sistema, por el método de Newton-Raphson, mostró los siguientes valores de convergencia: A = 0.71; B = 0.85 y C = 0.31. Usando la transformación (X_i = valor óptimo del factor [(límite superior del factor – límite inferior del factor)/2] + valor intermedio del factor) se obtuvieron los valores decodificados de cada variable. El procedimiento indicó que la fermentación en estado sólido de la flor de cempoalxochitl se debe realizar a 73.75% de contenido de humedad en el sistema, agitación intermitente cada 14.78 horas y 4.14 litros por minuto de aire de entrada para maximizar la extracción de xantofilas totales (Figura 9.10). El ensayo de comprobación realizado con estas condiciones dió un rendimiento de extracción de 17.81 g de xantofilas totales / kg de harina de flor de cempoalxochitl fermentada (peso seco), valor de concentración mayor en un 78% comparado con harinas (8-10 g de xantofilas /Kg de harina) obtenidas del proceso industrial (ensilado) tradicional (Industrias Alcosa).

Análisis del producto fermentado por HPLC.

La oleorresina extraída de la harina de flor del cempoalxochitl fermentada se analizó en HPLC y se determinó el perfil y concentración de sus componentes principales (Figura 9.11). El resultado mostró la presencia de trans-luteína (85.59%) y trans-zeaxantina (4.54%) en concentraciones similares al estándar.

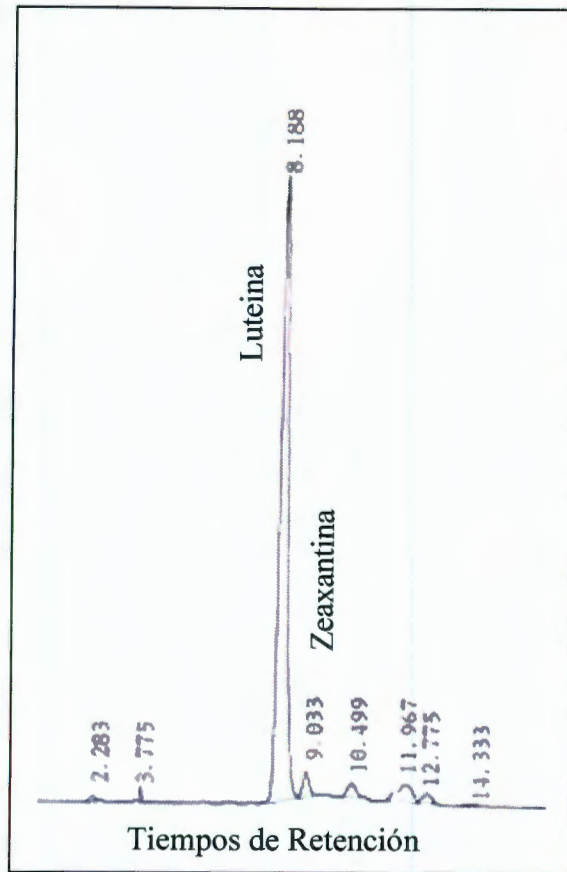


Figura 9.11. Cromatograma de HPLC de oleorresina extraída de harina de flor fermentada.

9.4.1. CONCLUSIONES PARCIALES

En esta parte del estudio se mostró cómo la FES mejoró la extracción de xantofilas de la flor de cempoalxochitl. El proceso se optimizó por la metodología de superficie de respuesta y permite obtener productos con altos contenidos de xantofilas hasta en un 78% mayor comparado con los productos que se obtienen en el proceso tradicional (ensilado) industrial. Sin embargo, este valor también es 25% menor que el obtenido en otros estudios (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997; Navarrete y col., 2003). La diferencia se atribuye tanto a la materia prima que se utilizó como al tipo de tratamiento. En ambos estudios se usaron solo pétalos de la flor del cempoalxochitl, donde se encuentran concentradas las xantofilas y en el proceso descrito de FES se usó toda la flor de cempoalxochitl, incluyendo los receptáculos que contribuyen con el 30% promedio de la flor total. Así, cuando se realizó el balance de masa se obtuvieron valores similares de rendimiento en la extracción de xantofilas. Además, aún cuando los tratamientos enzimáticos reducen el tiempo de proceso, se requiere una etapa adicional para remover la cantidad sustancial de agua previo a la etapa de extracción y la limitante del escalamiento para procesar grandes cantidades de materia prima.

Por otro lado, el diseño modular del sistema de FES que se usó en este trabajo, permitió controlar y cuantificar las variables críticas. Se comprobó que la interacción de las variables deben satisfacer los requerimientos del sistema biológico. La agitación y la aireación para facilitar la transferencia de masa entre las fases gas-sólido y evitar la generación de gradientes significativos de calor en el sistema. La aireación y humedad para la humectación del substrato, la humedad y agitación para homogeneizar la humectación. Con relación a las variables principales, se requiere la agitación para homogeneizar los componentes dentro del sistema de fermentación, se requiere humedad dentro del sistema para humectar el substrato y se requiere airear el sistema para el control de temperatura y el intercambio de gases. A diferencia del ensilado tradicional, este estudio demuestra que se requiere mantener una concentración de oxígeno en el sistema para facilitar la actividad microbiana. Esta diferencia de limitar o no el sistema de oxígeno es determinante para obtener productos concentrados de xantofilas.

Con estos resultados se puede pensar en mejorar el diseño del equipo de FES y convertirlo en una alternativa viable a considerar para la fermentación de la flor del cempoalxochitl.

9.5. Caracterización de la celulasa sintetizada por los microorganismos asociados al cempoalxochitl.

Soluciones de CMC tratadas con las enzimas del extracto crudo y comercial fueron analizadas para determinar azúcares reductores [método del ácido 3,5-Dinitro-Salicílico (DNS)] y glucosa [glucosa oxidasa (Método 600-PAP producto de E. Merck Darmstadt, R. F. Alemania)]. En todos los ensayos los resultados fueron negativos. Lo anterior supone que la enzima Endo- β -1,4, glucanasa es la celulasa sintetizadas por los microorganismos naturales asociados al cempoalxochitl.

9.5.1. Análisis de actividad de la enzima Endo- β -1,4, glucanasa

Con base en lo anterior, fueron realizados estudios comparativos entre los extractos enzimáticos de *Rhizopus nigricans* y enzima Endo- β -1-4- glucanasa de *Aspergillus niger* (celulasa de 5000 U, Sigma-Aldrich Co.) comercial. Se utilizaron dos lotes de soluciones de CMC con viscosidad inicial de 4700 cp, un lote se mezcló con 15 ml de enzima comercial a diferentes concentraciones y el otro lote con 15 ml de extracto enzimático crudo. Los resultados del cambio de viscosidad de los diferentes tratamientos mostraron que la concentración de enzima comercial equivalente a la secretada por el hongo *Rhizopus nigricans* (H₁) es de 0.025 gE/l (Figura 9.27). Análisis similares para los otros microorganismos con actividad enzimática significativa mostró para *Flavobacterium Iib* 0.0015 gE/l, *Acinetobacter anitratus* 0.003 gE/l y *Enterobacter aerogenes* 0.003 gE/l.

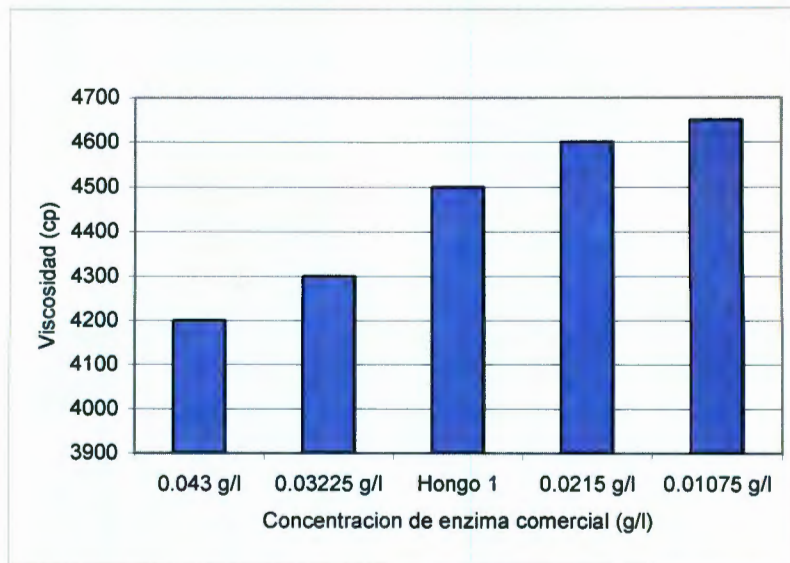


Figura 9.12. Celulasa de *Rhizopus nigricans* contra Endo- β -1-4- glucanasa de *Aspergillus niger*.

9.6. TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS

9.6.1. Efecto del tratamiento enzimático en la extracción de xantofilas totales.

Harinas obtenidas del tratamiento de la flor del cempoalxochitl con el extracto enzimático crudo de *Rhizopus n*, muestran un incremento en la concentración correlacionado directamente a la actividad enzimática del extracto. Para las muestras incubadas con agitación el incremento parece ser independiente de la condición de la materia prima (pétalos frescos o deshidratados). Harinas con 29.0 (± 0.1) gramos de xantofilas totales por kilogramo de harina (peso seco) pueden ser obtenidas después de 5 horas de tratamiento (Figura 9.13), tiempos de tratamiento posteriores no afectan la concentración de xantofilas en las harinas. Similar comportamiento fue observado en las muestras obtenidas del tratamiento usando pétalos secos como materia prima (Figura 9.13). Harinas con 29.3 (± 0.1) gramos de xantofilas totales por kilogramo de harina (peso seco) pueden ser obtenidas en el mismo tiempo de tratamiento. Sin embargo, la figura 9.13 también muestra que el extracto enzimático actúa con más rapidez sobre los pétalos deshidratados que sobre los pétalos frescos. Paralelamente se realizaron ensayos de tratamiento usando soluciones de enzimas comerciales al 0.05% (p/v), los resultados de estos ensayos muestran que es posible obtener harinas de pétalos de flor con 23.9 (± 0.1) gramos de xantofilas totales por kilogramo de harina (peso seco) en 120 horas de tratamiento si se usan pétalos secos como materia prima (Figura 9.13). Resultados que son comparados favorablemente con aquellos reportados por Delgado-Vargas y Paredes-López (1997), la diferencia observada no es significativa y puede ser atribuida a variables no controlables como son la variedad, el grado de madurez de la flor y al tipo de actividad de las enzimas usadas entre ambos estudios. Sin embargo, es notorio que existe una diferencia significativa en la reducción del tiempo de proceso en 95% (promedio) entre los tratamientos usando el extracto enzimático crudo obtenido de *Rhizopus n* y la solución de enzima comercial (Figura 9.13). Además, en estos ensayos se comprobó que el uso de soluciones a base de enzimas comerciales en el tratamiento enzimático no afecta la concentración de xantofilas en las harinas cuando se emplean pétalos frescos, fenómeno también descrito por Delgado-Vargas y Paredes-López (1997). En principio, este comportamiento fue atribuido a posibles modificaciones de la pared celular de los pétalos

durante el proceso de deshidratación o secado, sin embargo, el tratamiento enzimático usando el extracto obtenido de *Rhizopus n* permite obtener harinas con alta concentración de xantofilas aún usando pétalos frescos (Figura 9.13). Actualmente, no tenemos una explicación lógica que describa la falta de actividad de las soluciones de enzima comercial sobre pétalos frescos y la alta actividad del extracto enzimático, tentativamente creemos que el extracto enzimático sintetizado por *Rhizopus n* contiene, además de celulasas, otras enzimas que facilitan la actividad de la celulasa sobre las paredes celulares de los pétalos de la flor del cempoalxochitl.

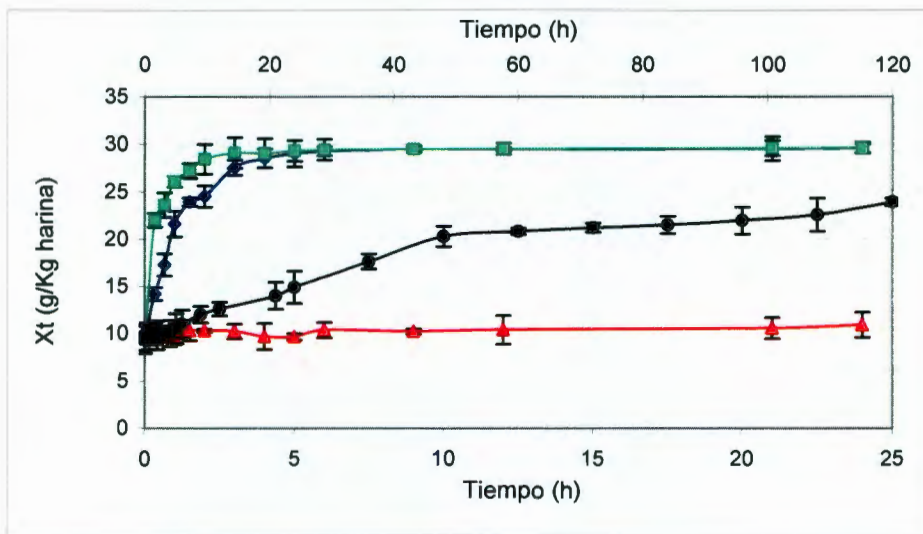


Figura 9.13. Efecto del tratamiento enzimático sobre la concentración de xantofilas en sistemas agitados: tratamiento el extracto enzimático crudo sobre pétalos secos (■) y pétalos frescos (◆); tratamiento con solución de enzima comercial sobre pétalos secos (●) y pétalos frescos (▲).

9.6.2. Efecto del tratamiento enzimático sobre pétalos de flor del cempoalxochitl.

Inspecciones visuales sobre las muestras tratadas con el extracto enzimático crudo revelan, después de 1.5 h, la presencia de partículas finas de pétalo suspendidas en el sobrenadante, resultado de la actividad hidrolítica de las enzimas. A tiempos posteriores, se observó un incremento gradual del material sólido suspendido directamente correlacionado

con el tiempo de tratamiento. Aproximadamente, a las 5 h de tratamiento, la estructura de los pétalos ha sido totalmente destruida y la máxima concentración de xantofilas es alcanzada (Figura 9.14). Sin embargo, si el producto obtenido después de las 5 h de tratamiento no es adecuadamente separado, hasta un 30% de la concentración de xantofilas puede perderse (ΔX_t , Figura 9.14). Esta observación es consistente con reportes previos (Barzana y col. 2002), donde la ineficiencia de la extracción comercial tradicional ha sido declarada. Sin embargo, las pérdidas de xantofilas en el tratamiento enzimático pueden ser parcialmente reducidas, a tan sólo un 10% a medida que las partículas sólidas del sobrenadante son acumuladas sobre el filtro formando una retorta que actúa como un segundo filtro (Figura 9.14). Sin embargo, el nuevo sistema requiere de presión adicional para realizar la separación considerando la resistencia ofrecida por la retorta.

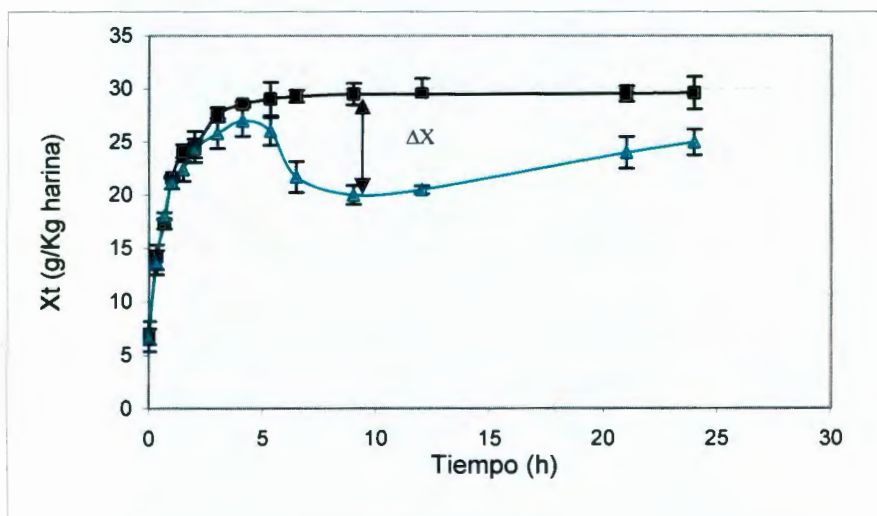


Figura 9.14. Efecto del tratamiento enzimático sobre sistemas agitados usando el extracto enzimático crudo sobre pétalos frescos: tratamiento con sistema de filtración eficiente para prevenir las pérdidas de xantofilas (■) y tratamiento con sistema de filtración con formación de retorta (▲).

9.6.3. Evaluación de la actividad enzimática residual.

Para evaluar la actividad enzimática residual durante el tratamiento enzimático, las muestras tratadas fueron filtradas para separar las fases, alícuotas del sobrenadante fueron adicionadas a soluciones de CMC para evaluar la actividad enzimática residual. Los

resultados muestran que la viscosidad de las soluciones de CMC disminuye constantemente durante las primeras 1.5 h, correlacionado con el incremento en los valores de concentración de xantofilas en las harinas tratadas (Figura 9.15). Aparentemente, la reducción en la viscosidad de las soluciones de CMC está asociada a la adsorción de la enzima dentro de los pétalos llevando ésto a un incremento de la concentración de xantofilas, como resultado de la actividad enzimática. Durante las siguientes 7.5 h de tratamiento, la actividad enzimática residual se recupera gradualmente alcanzando hasta el 80% (± 2) de su valor original ($t=0$). Aparentemente, la actividad incrementa debido a la desorción de la enzima, caracterizada por los cambios en la estructura de los pétalos y un incremento de las partículas suspendidas en el sobrenadante. Sin embargo, la recuperación de la actividad enzimática no se observa después de 9 h de tratamiento, aparentemente este comportamiento esta correlacionado a una retención de la enzima en la fase sólida cuando las muestras fueron filtradas, fenómeno similar al observado para las pérdidas de xantofilas mencionadas anteriormente.

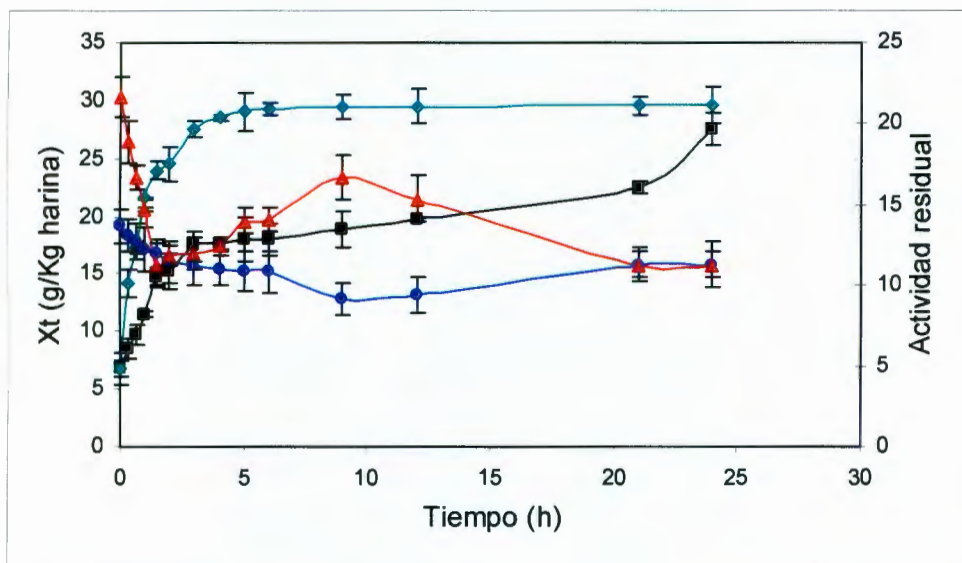


Figura 9.15. Efecto del tratamiento enzimático en la concentración de xantofilas sobre pétalos frescos para sistemas no agitados (eje izquierdo ■) y sistemas agitados (eje izquierdo ◆); cambios en la actividad enzimática residual con base a la reducción de la viscosidad de soluciones de CMC para sistemas no agitados (eje derecho ●) y sistemas agitados (eje derecho ▲).

De igual manera, se realizaron ensayos de tratamiento enzimático en sistemas no agitados, los resultados de estos ensayos muestran bajas concentraciones de xantofilas en las harinas tratadas para los mismos tiempos de tratamiento sobre sistemas agitados (Figura 9.15). Rendimientos similares (27.5 gramos de xantofilas por kilogramo de harina (peso seco)) a aquellos obtenidos sobre sistemas agitados sólo son observados después de 24 h de tratamiento (Figura 9.15). Además, la figura 9.15 también muestra tendencias similares con relación a la adsorción y actividad entre sistemas agitados y no agitados. Sin embargo, en las muestras tratadas en sistemas no agitados nunca se observó la degradación total o parcial de los pétalos, que se caracteriza por la presencia de partículas en el sobrenadante, y por lo tanto la actividad enzimática residual nunca exhibió una recuperación significativa. Con base a estos resultados, se puede concluir que la agitación juega un papel importante en los sistemas de tratamiento enzimático al favorecer la adsorción, actividad y desorción de la enzima, maximizando la eficiencia del proceso al incrementar la concentración de xantofilas en las harinas de flor del cempoalxochitl obtenidas del tratamiento enzimático. Al parecer, la agitación facilita la difusión de la enzima del sobrenadante (fase líquida) a los pétalos de la flor del cempoalxochitl (fase sólida), la rápida absorción acelera la depolimerización de la pared celular, facilita el intercambio de materia hidrosoluble e incrementa la concentración de xantofilas en los productos tratados. Además, la agitación favorece la pulverización del material sólido, que guía a un incremento en el área interfacial disponible en el sólido que facilita la desorción de la enzima. La rapidez con la que se realiza la desorción es una característica deseable para fines de eficiencia en las etapas de separación, recuperación y reutilización del extracto enzimático.

9.6.4. Efecto del tratamiento enzimático sobre los componentes estructurales de la pared celular de los pétalos de la flor del cempoalxochitl.

Las muestras tratadas en sistemas agitados a diferentes tiempos, fueron analizadas por métodos gravimétricos para estimar los cambios en el perfil de componentes estructurales: la fracción de fibra neutro-detergente (FND) se cuantificó de acuerdo al método descrito por Van Soest y Wine (1967), mientras que la fracción de contenido celular se determinó por la diferencia 1-FND. La fracción de fibra ácido-detergente (FAD) se determina con el método de Van Soest y Wine (1968). El residuo de FAD se trató con

ácido sulfúrico (72%) para obtener la fracción lignina-detergente (LD) (Van Soest y Wine, 1968). La diferencia FND-FAD representa el contenido de hemicelulosa, y la fracción de celulosa se obtiene con la diferencia FAD-LD. Los resultados (Figura 9.16) mostraron que los perfiles de concentración de celulosa y hemicelulosa siguen una tendencia similar a la observada para los rendimientos de la extracción de xantofilas. Este comportamiento confirmó que durante los primeros tiempos, hasta 1.5 h de tratamiento, existe un efecto simultáneo de adsorción y actividad de la enzima. En tiempos posteriores el contenido de celulosa y hemicelulosa permaneció constante, lo cual confirmó que el tiempo de tratamiento asociado a la actividad de la enzima fue de tan sólo 1.5 horas.

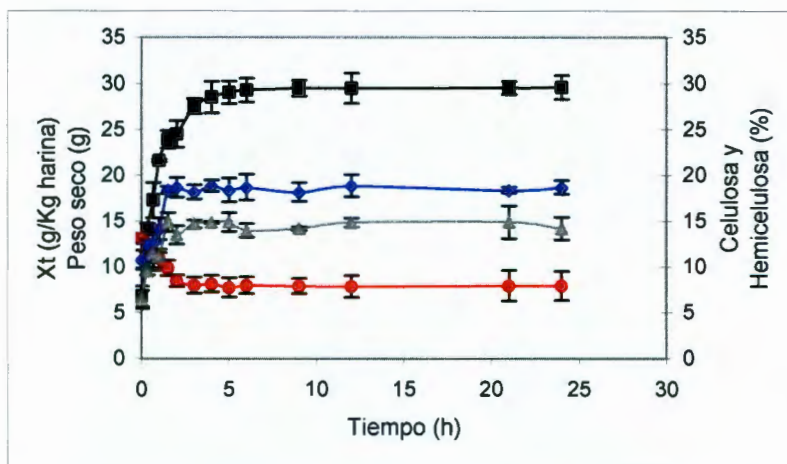


Figura 9.16. Efecto del tratamiento enzimático sobre la composición de los pétalos (celulosa (◆) hemicelulosa (▲) eje derecho), pérdida de peso en la fase sólida (eje izquierdo (●)) y concentración de xantofilas ((■) eje izquierdo).

Así mismo, se observa que el cambio en el contenido de celulosa y hemicelulosa aparentemente está correlacionado al cambio en la permeabilidad de la pared celular durante el tratamiento enzimático, facilitando la transferencia de masa entre la fase sólida (pétalos) y la fase líquida (extracto enzimático). Durante el proceso, la masa de la fase sólida disminuye constantemente y en consecuencia los componentes insolubles (por ejemplo, xantofilas) incrementan su concentración en la fase sólida (Figura 9.17), fenómeno que fue posteriormente confirmado por los cambios registrados en el peso de las muestras tratadas (Figura 9.16).

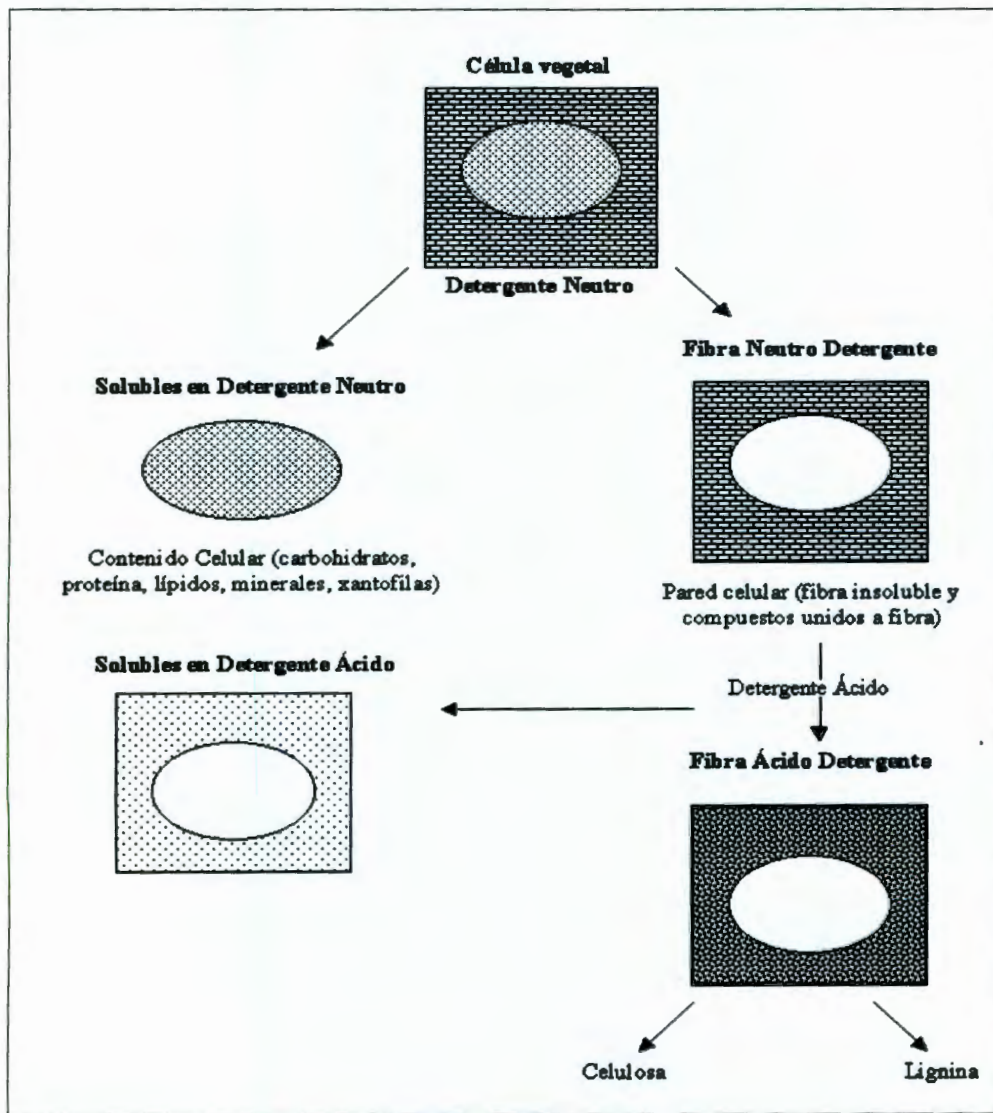


Figura 9.17. Esquema de tratamiento con FND y FAD para llevar a cabo la depolimerización de la célula y separar sus componentes estructurales.

El análisis total de estos resultados sugieren que la etapa de reacción-adsorción es la limitante y está favorecida por la agitación. Como consecuencia, altos valores de concentración de xantofilas y una reducción sustancial en el tiempo de proceso son obtenidos como resultado de muestras tratadas en sistemas agitados. En este estudio, el análisis global de los datos muestra que el tiempo de tratamiento debe ser de 5 h, en este tiempo se obtiene la máxima concentración de xantofilas en las harinas tratadas, las pérdidas de xantofilas de la fase líquida pueden ser minimizadas, el sustrato para la actividad hidrolítica de la enzima ha alcanzado un mínimo, el área interfacial ha sido maximizada y la enzima se ha desorbido del sustrato (fase sólida), misma que puede ser recuperada y reutilizada en tratamientos posteriores.

9.6.5. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Harinas obtenidas del extracto enzimático en sistemas agitados fueron analizadas por HPLC para determinar la concentración y perfil de componentes principales. El cromatograma (Figura 9.18) muestra que los componentes principales son luteína (84.7%) y zeaxantina (4.5%). Este análisis, por comparación con perfiles reportados previamente (Quanckenbush y Miller, 1972), indica que las concentraciones son conservadas.

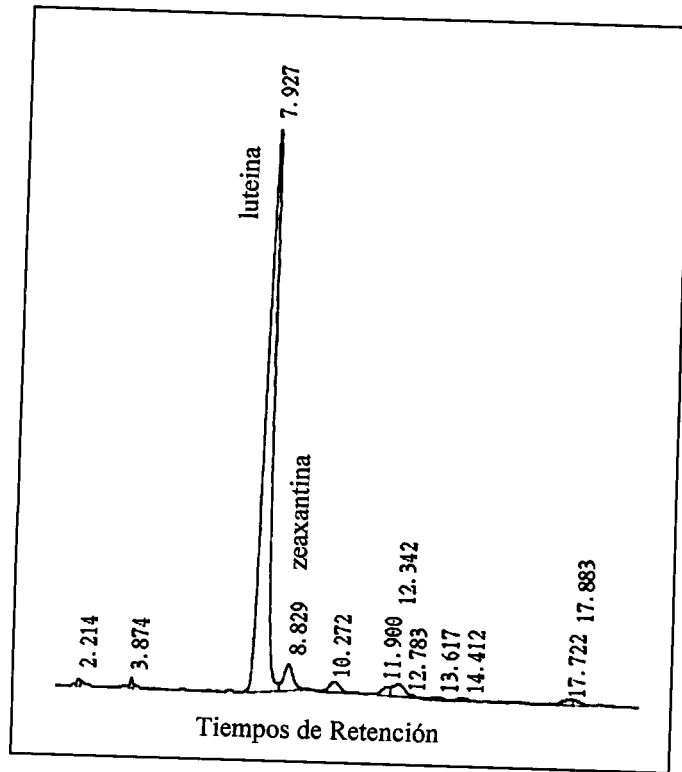


Figura 9.18. Cromatograma de HPLC de la oleorresina saponificada obtenida como producto final de muestras de flor del cempoalxochitl tratadas con el extracto enzimático crudo.

9.6.6. CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados que aquí se presentan indican que la máxima producción de celulasa por fermentación sumergida, usando el hongo *Rhizopus nigricans* sobre medio de caldo papa dextrosa se obtiene cuando el sistema de fermentación opera a 27.8 °C, 0.036 litros de aire por minuto (10, lectura en el rotámetro) y 50 revoluciones por minuto, obteniéndose una respuesta experimental en la reducción de la viscosidad del 90 % (± 2), comparada favorablemente a lo predicho por el modelo que indica una reducción del 93.345%. Además, se estableció que la cantidad de celulasa producida por el metabolismo de *Rhizopus nigricans*, bajo estas condiciones, corresponde a 0.05 gE/lit [0.005 (± 0.001) % (p/v)] con 5000 U de actividad, comparada con un estándar de enzima comercial producida por *Aspergillus niger*.

Empleando el extracto enzimático crudo, sintetizado por dicho microorganismo cuando el sistema de fermentación opera bajo las condiciones óptimas, pudo confirmarse que la extracción de xantofilas a partir de la flor del cempoalxochitl se puede mejorar usando enzimas celulolíticas. Se pueden obtener harinas con alto contenido de xantofilas (29.3 g de xantofilas totales por kilogramo, peso seco) después de tan sólo 5 horas de tratamiento, usando el extracto crudo enzimático sobre pétalos deshidratados.

El proceso descrito comparado con los comerciales tradicionales y con estudios similares reportados, presenta grandes ventajas: 1) es más eficiente en cuanto a costos, ya que el extracto enzimático se produce *in situ* a partir de *Rhizopus nigricans*, 2) se logró una reducción sustancial del tiempo de proceso y obtener productos con altos contenidos de xantofilas totales sin alterar los perfiles y ni composición en la materia prima como lo demuestran los resultados del HPLC y 3) el extracto de *Rhizopus nigricans* puede usarse para el tratamiento enzimático de flor del cempoalxochitl sin importar su condición (fresca o seca).

La producción *in situ* de la enzima y la reducción en el tiempo de tratamiento son características que pueden ser decisivas cuando se evalúa la viabilidad económica del proceso. Aunado a ello, el establecer la relación entre la cantidad de materia a tratar y el volumen de extracto enzimático (10% p/v), abre la posibilidad de realizar el prediseño de un proceso semi-continuo o continuo.

9.7. ANÁLISIS DEL PROCESO DE LIXIVIACION DE XANTOFILAS.

9.7.1. Lixiviación de xantofilas totales

Actualmente a nivel industrial, la extracción de xantofilas totales de harina de flor del cempoalxochitl se realiza por lixiviación con hexano, que al igual que otros procesos de separación, su diseño se ve afectado por la carencia de datos de distribución entre fases inmiscibles. Como resultado se proponen diseños inapropiados que son ineficientes y por consiguiente presentan deficiente recuperación de productos, costos elevados de operación o requieren incluir etapas adicionales de separación y purificación.

En esta parte, se analiza la estrategia para optimizar el proceso de lixiviación para la extracción de xantofilas totales con hexano (apartado 7.4.7), donde se analizan las variables A: peso de la muestra de harina (1.0 y 2.0 g), B: volumen de solvente (100 y 200 mL), C: temperatura de extracción (30 y 40 °C) y D: tiempo de extracción (5.0 y 10.0 min), ajustados a un esquema experimental $2^{4-1}+3C$. Los resultados (última columna del Cuadro 9.16) de los experimentos realizados muestran, con base al análisis de varianza (Cuadro 9.17) y un intervalo de confianza de 0.05, a los factores principales A, y D como significativos y en menor grado el factor B y la interacción $AB = CD$.

Cuadro 9.16. Resultados de la extracción de xantofilas totales del diseño $2^{4-1}+3C$.

No. corrida	A (Harina)	B (Solvente)	C (temperatura)	D (tiempo)	rendimientos [Xt] _H
1	-1	+1	-1	+1	60.80
2	-1	-1	+1	+1	53.12
3	0	0	0	0	76.52
4	+1	-1	+1	-1	88.54
5	0	0	0	0	79.68
6	+1	+1	+1	+1	97.39
7	+1	-1	-1	+1	125.22
8	+1	+1	-1	-1	55.65
9	-1	-1	-1	-1	43.64
10	-1	+1	+1	-1	36.26
11	0	0	0	0	76.52

[Xt]_H = Concentración de Xantofilas totales en la harina: gramos de xantofilas totales / kilogramo de harina.

Se demostró, usando el algoritmo de Yates, que el factor C (temperatura) no fue significativo en los rendimientos de extracción de xantofilas en la región explorada en este primer esquema experimental. Consecuentemente, se fijó como constante esta variable en el nivel intermedio (35 °C) para el resto de los experimentos.

Cuadro 9.17. Análisis de varianza para el diseño $2^{4-1}+3C$.

Fuente de variación	S. C.	G.L	P. V.
Efectos principales			
Factor A: peso de flor	3740.26	1	0.0026
Factor B: volúmen de hexano	456.322	1	0.0473
Factor C: temperatura	12.5	1	0.6275
Factor D: tiempo	1580.34	1	0.0090
AB + CD	465.43	1	0.0462
AC + BD	50.6018	1	0.3578
AD + BC	246.42	1	0.0967
Error total	129.248	3	
	6681.248		

S.C. : suma de cuadrados; G.L : grados de libertad; P.V. : valor de distribución de probabilidad.

Con esta información, se describió la relación que existe entre los factores importantes A, B y D construyendo el modelo polinomial de regresión por mínimos cuadrados:

$$[Xt]_0 = 72.12 + 21.62A - 7.55B + 14.05D$$

Donde las variables se especifican en sus unidades codificadas. Esta ecuación supone implícitamente que la dependencia de la variable de respuesta con respecto a los factores es lineal y que los efectos de estos factores son aditivos. El análisis de varianza (Cuadro 9.18) mostró que el modelo es una buena aproximación geométrica de la función de respuesta en la región experimental explorada.

Cuadro 9.18. Análisis de varianza para el modelo de primer orden.

Fuente de variación	S.C	G.L	P. V.
Modelo de primer orden	5776.77	3	0.002
Residual	904.13	7	
Total	6680.9	10	

$R^2 = 86.467$; Error estandar = 11.367

S.C.: Suma de cuadrados; G.L.: Grados de libertad; P.V. : Valor de distribución de probabilidad.

Tentativamente el modelo se aceptó como una representación geométrica robusta de la función de respuesta subyacente *en la región experimental explorada*. Usando este modelo, se buscó la región que maximiza la extracción de xantofilas, siguiendo el camino de etapa ascendente.

La extrapolación mostró las condiciones de los ensayos que incrementan los rendimientos de la extracción (Cuadro 9.19). Los resultados de éstos mostraron incrementos hasta el ensayo 14, ensayos adicionales no son viables porque el volumen de solvente se reduce a cero (ensayo 15). Estos resultados proponen que la nueva región experimental de análisis sea para los valores de variables alrededor del ensayo 14.

Cuadro 9.19. Ensayos experimentales realizados para incrementar la concentración de xantofilas en la extracción con base al camino de la etapa ascendente.

Ensayo	Unidades codificadas			A	B	D	[Xt] _o
	X ₁	X ₂	X ₄	Harina de flor (g.)	Hexano (ml)	Tiempo (min)	
3,5,11	0	0	0	1.5	150	7.5	72.12
12	1.53	-0.68	1.0	2.26	123.5	10.0	92.93
13	3.12	-1.56	2.0	3.06	97	12.5	102.86
14	4.78	-2.57	3.0	3.89	71.5	15.0	125.49
15	6.51	-3.68	4.0	4.71	-32.58	17.5	-----

[Xt]_H = Concentración de Xantofilas totales en la oleoresina
gramos de xantofilas totales / kilogramo de oleoresina.

En esta región se construyó un nuevo diseño (Cuadro 9.20) con características rotatables (Box-Behnken) que incluyó solo las variables A,B y D, sugeridas en el primer diseño y los niveles resultado de la extrapolación del camino de la etapa ascendente (A: 3 y 5 g, B: 16 y 26 ml, D: 12.5 y 17.5 min).

Cuadro 9.20. Diseño de Box-Behnken y resultados obtenidos de cada ensayo.

Ensayo	Harina	Hexano	Tiempo	[Ht] _o
1	-1	-1	0	114.98
2	-1	+1	0	118.84
3	+1	-1	0	134.18
4	+1	+1	0	138.68
5	-1	0	-1	113.7
6	-1	0	+1	119.7
7	+1	0	-1	130.2
8	+1	0	+1	121.7
9	0	-1	-1	111.74
10	0	-1	+1	112.82
11	0	+1	-1	128.76
12	0	+1	+1	132.76
13	0	0	0	135.74
14	0	0	0	133.98
15	0	0	0	137.8

[Xt]_H = gramos de xantofilas totales/kilogramo de oleoresina.

Los resultados permitieron describir el sistema construyendo el modelo de segundo orden vía mínimos cuadrados.

$$[Xt]_o = 135.84 + 7.30A + 5.60B + 0.35 D - 4.66 A^2 - 4.41B^2 - 9.98D^2 - 0.028AB - 3.75AD + 0.79BD$$

El modelo se usó para construir gráficos de respuesta (Figura 9.19 a, b y c). Estos gráficos sugieren la presencia de un óptimo global, conjunto de condiciones de operación de las tres variables, que da como resultado máxima extracción de xantofilas.

La localización del óptimo se definió, para un sistema multidimensional, por la solución al sistema de ecuaciones lineales obtenidas al derivar el modelo de segundo orden:

$$\frac{\partial[Xt]}{\partial A} = 7.30 - (2)4.66A - 0.028B - 3.75D = 0$$

$$\frac{\partial[Xt]}{\partial B} = 5.60 - 0.028A - (2)4.41B + 0.79D = 0$$

$$\frac{\partial[Xt]}{\partial D} = 0.35 - 3.75A + 0.79B - (2)9.98D = 0$$

La solución del sistema dio los siguientes resultados: A = 0.83, B = 0.62 y D = -0.11 como valores óptimos para la extracción. Usando la transformación $(X_i = \text{valor óptimo del factor} [(\text{límite superior del factor} - \text{límite inferior del factor})/2] + \text{valor intermedio del factor})$ se obtienen los valores decodificados de los factores. Este procedimiento indicó que la extracción de xantofilas se maximiza para una relación harina - hexano en proporción de 1:5 en un tiempo de contacto de 14.7 minutos (Figuras 9.19 a, b y c). El ensayo de comprobación con estas condiciones dio una respuesta de 138.28 g de xantofilas / kg de oleorresina, valor que se compara favorablemente contra el valor predicho por el modelo de 140.58 g de xantofilas / kg de oleorresina.

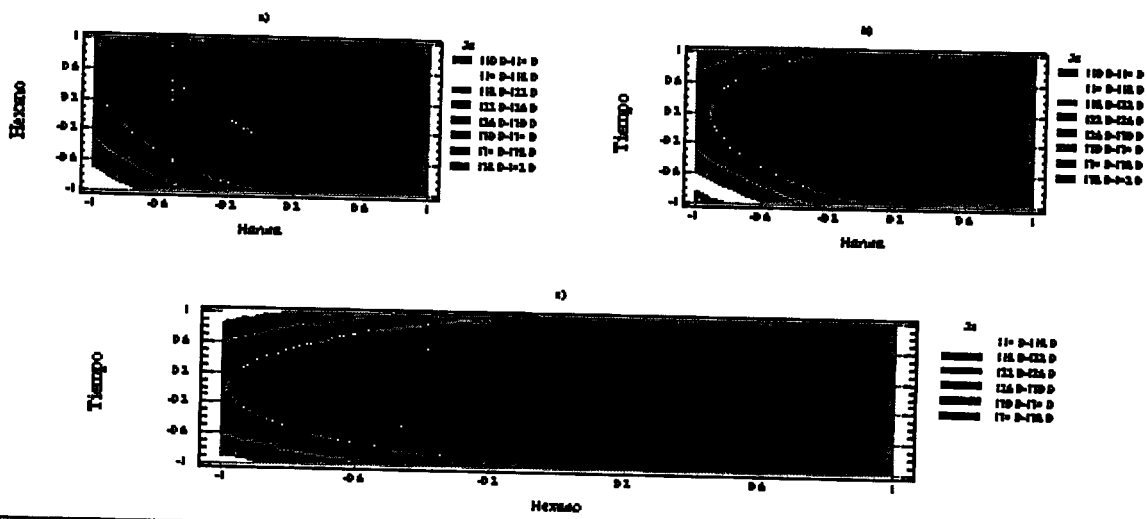


Figura 9.19. Contornos de superficie de respuesta estimada con el modelo de segundo orden.

9.7.2. Cinética de extracción de xantofilas

Con las condiciones óptimas se realizó una cinética de extracción por contacto simple y se evaluó el cambio en la concentración de xantofilas totales en hexano. El análisis de los datos obtenidos (Figura 9.20) indican que a los 15 minutos se alcanzó la máxima extracción de xantofilas totales en la fase líquida. Tiempos posteriores no muestran cambios significativos en la concentración de xantofilas totales. El ensayo confirmó que los valores obtenidos por la metodología de superficie de respuesta optimizan la extracción con hexano de xantofilas totales a partir de harina.

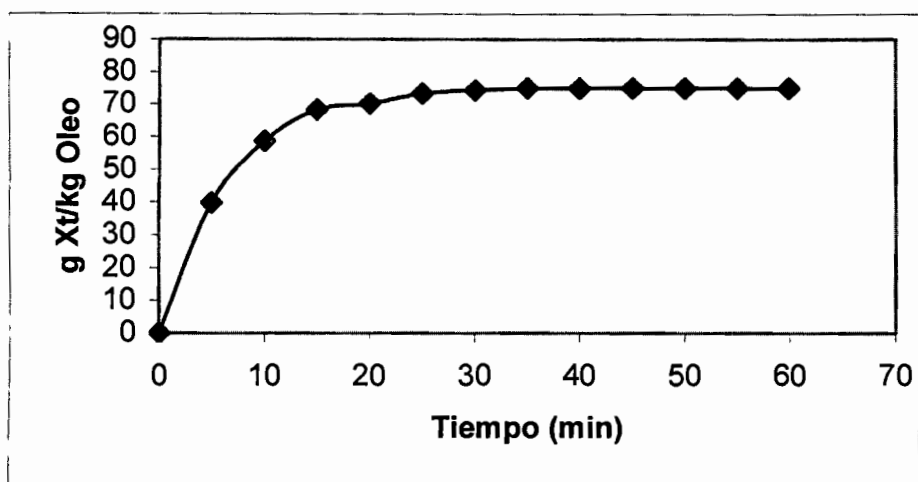


Figura 9.20. Cinética de la extracción de xantofilas totales de harina de flor del cempoalxochitl con hexano.

9.7.3. Extracción a contracorriente en etapas múltiples.

Con condiciones óptimas, se instaló una batería de extracción de operación a contracorriente con nueve etapas (sistema de Shanks). En el estado estable, la fase líquida (extracto) y la fase sólida (harina lixiviada) de cada etapa fueron separadas por filtración. Los extractos que consistieron de una mezcla hexano-xantofilas extraídas-ácidos grasos, se concentraron hasta eliminar el hexano. Las oleorresinas obtenidas se analizaron y se determinó la concentración de xantofilas totales (Cuadro 9.21). Las harinas lixiviadas que consisten de una mezcla hexano, xantofilas no recuperadas-harina, se desolventizaron para remover el hexano retenido en la extracción. Las harinas libres de hexano se analizaron y

determinó la concentración de xantofilas totales (Cuadro 9.21). El análisis del extracto de la última etapa (etapa 9) reveló que se recuperó el 97.5% de la cantidad original de xantofilas contenidas en la harina (Cuadro 9.21). Las xantofilas que no se recuperaron, cuantificadas en la primera etapa, representan el 1.55% de las xantofilas totales presentes en la materia prima. Los balances de masa del sistema indicaron una pérdida de 0.95% de las xantofilas totales debido en parte a depósito de producto en el equipo de laboratorio.

Cuadro 9.21. Distribución porcentual de xantofilas totales por etapas.

No. Etapa	X	Y
1	1.55	0.41
2	1.98	1.12
3	2.03	2.04
4	4.32	8.49
5	12.8	19.95
6	22.7	28.87
7	34.8	47.62
8	48.4	70.67
9	72.3	97.5

x = porcentaje de xantofilas totales en la fase sólida

y = porcentaje de xantofilas totales en la fase líquida

9.7.4. CONCLUSIONES PARCIALES

El proceso óptimo de extracción a contracorriente (relación 1:5 harina – hexano, 14.7 minutos de contacto entre fases, 35 °C de temperatura) permitió obtener los mayores rendimientos en la extracción de xantofilas totales (138.28 g de xantofilas / kg de oleorresina)

Los resultados de la distribución de datos de equilibrio obtenidos de la batería de extracción pueden ser utilizados para el prediseño de una planta de lixiviación de xantofilas de harina de flor del cempoalxochitl con hexano.

Las condiciones de operación óptimas serían la base para determinar el área de sección transversal del equipo y los requerimientos de energía para su operación, que implícitamente determinan la eficiencia de cada etapa, garantizar altos rendimientos en la recuperación y la ausencia de cambios no deseados en los productos finales.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo, se caracterizó parcialmente el proceso de ensilado de la flor del cempoalxochitl para incrementar los rendimientos de la extracción de xantofilas totales. Se aislaron e identificaron los microorganismos saprófitos asociados a la flor del cempoalxochitl [*Flavobacterium Iib*, *Acinetobacter anitratus*, *Enterobacter intermedius*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans*, *Rhizopus nigricans* y *Geotrichum candidum*].

Los estudios cinéticos de crecimiento y actividad enzimática mostraron que las bacterias *Flavobacterium Iib* y *Acinetobacter anitratus* y el hongo *Rhizopus nigricans* para tiempos de propagación de 16, 23, 26 horas respectivamente producen un extracto con la mayor cantidad de celulasa. Estos resultados definieron el periodo de propalación de cada microorganismo para preparar el cultivo mixto de los estudios de ensilado y fermentación.

Los estudios de ensilado, basados en diseño de mezclas y en la metodología de superficie de respuesta, revelaron que el inóculo compuesto de C₁: *Flavobacterium Iib* = 9.8%; C₂: *Acinetobacter anitratus* = 41% y H₁: *Rhizopus nigricans* = 49.2% incrementó de forma significativa la extracción de xantofilas totales (24.94 g/kg de harina en base seca), 90% más que el control (12.95 g/kg de harina en base seca).

El proceso óptimo de fermentación en fase sólida (73.75% de humedad, 14.78 horas de intervalo de agitación, 4.14 litros por minuto de aire, 1250 g de flor fresca, 28 °C de temperatura y 7 días de proceso) permite obtener productos con altos contenidos de xantofilas (17.81 g de xantofilas totales / kg de harina de flor de cempoalxochitl fermentada en peso seco), cantidad superior en un 78% (promedio) comparado con los productos que se obtienen en el proceso tradicional (ensilado) industrial (8-10 g de xantofilas totales / kg de harina de flor ensilada de cempoalxochitl peso seco). Sin embargo, este valor también es 25% menor que el obtenido en otros estudios (Delgado-Vargas y Paredes-López, 1997; Navarrete y col., 2003). La diferencia se atribuye tanto a la materia prima que se utilizó como al tipo de tratamiento.

A diferencia del ensilado tradicional, el estudio de fermentación en estado sólido muestra que se requiere mantener una concentración de oxígeno en el sistema para facilitar la actividad microbiana (sobre todo de *Rhizopus nigricans*). La no limitación del suministro

de oxígeno puede ser determinante para obtener productos fermentados con altos contenidos de xantofilas totales.

Los estudios del tratamiento enzimático con extractos crudos confirman que la extracción de xantofilas a partir de flor de cempoalxochitl se incrementa utilizando enzimas con actividad sobre celulosa.

Harinas con alto contenido de xantofilas [29.3 g/Kg de harina (peso seco)] se obtienen en solo 5 horas de tratamiento enzimático obtenido a partir de *Rhizopus nigricans* cuando las muestras son agitadas.

El proceso descrito, comparado con los tradicionales y con estudios similares reportados, presenta grandes ventajas: 1) es económico al usar un extracto enzimático no comercial, producto de la actividad de *Rhizopus nigricans*, y 2) se reduce significativamente el tiempo de proceso (120 a 5 h) y se obtienen productos con altos contenidos de xantofilas totales sin alterar su perfil y composición.

Los resultados del tratamiento enzimático (5 horas de tiempo de tratamiento, relación entre la cantidad de materia a tratar y el volumen de extracto enzimático de 1:10 (p/v), 28 °C de temperatura en un sistema agitado) establecen la posibilidad de realizar el prediseño de un proceso semi-continuo o continuo viable.

Los resultados descritos en los estudios de actividad enzimática, ensilado, fermentación y tratamiento enzimático confirman que la celulasa es uno de los principales factores responsables de la degradación de los polímeros estructurales de las paredes celulares en los pétalos de la flor de cempoalxochitl, facilitando así la transferencia de masa e incrementando la extracción de xantofilas totales. Sin embargo, también muestran que la diferencia en los rendimientos de la extracción es el resultado de otra actividad enzimática de los microorganismos saprófitos asociados al cempoalxochitl que contribuyen a la interacción entre el rendimiento de xantofilas y la acción de la celulasa.

Por último, los análisis de variables que se presentan en este trabajo, muestran a la metodología de superficie de respuesta (MSR) como una herramienta de optimización versátil de relativamente fácil desarrollo.

La MSR trata en el análisis puntos que se encuentran dentro de regiones relacionadas con una alta probabilidad y obtiene aproximaciones de diferente orden de ajuste de modelos matemáticos de orden sucesivo, indicando un ajuste adecuado de datos.

También los análisis muestran que el ajuste entre el orden de magnitud y los valores de los factores relevantes predichos por modelos consecutivos, confirma que las condiciones que se obtienen se encuentran muy cercanas al óptimo estadístico. Sin embargo, la MSR presenta algunas limitaciones si las probabilidades de distribución de los datos muestran grandes irregularidades; en estos casos es posible que las predicciones de la densidad de probabilidad usando esta metodología no converjan.

En general, la MSR es útil para llevar a cabo análisis de modelos complicados en varios campos de la ingeniería. Representa una alternativa potencial valiosa de los métodos que se tienen en la actualidad de análisis de incertidumbre que están limitados al momento de computarse para sistemas complejos.

El uso de modelos de regresión basados en datos experimentales para describir fenómenos complejos debe examinarse cuidadosamente, pues los modelos resultantes pueden ser imprecisos debido a los errores experimentales y a una selección pobre de los “factores relevantes” y sus valores de operación. Bajo estas circunstancias, la predicción de las condiciones “óptimas” usando extrapolación de modelos siempre se debe probar.

La metodología de superficie de respuesta se aplica principalmente en el laboratorio o en la operación de plantas piloto, por lo que las condiciones que son óptimas a estos niveles pueden no serlo para procesos a gran escala. Generalmente, el escalamiento genera una distorsión de las condiciones óptimas. Aún cuando la planta a gran escala comience con la operación en el óptimo, eventualmente se “desviará” debido a los cambios en la materia prima, condiciones ambientales, equipo y personal de operación.

En un futuro, la MSR puede extenderse en su estudio para otro tipo de procesos del área Bioquímica o Química, cuando el análisis de datos no se pueda describir basándose en principios fundamentales.

XI. BIBLIOGRAFIA

- 1) Aidoo, K.E., Hendry, R. and Wood, B.J.B. 1982. Solid substrate fermentations. *Adv. Appl. Microbiol.* 28: 201-237.
- 2) Alam A. U., Couch J. R., Creger C.R. 1968. "The carotenoids of marigold *Tagetes erecta*". *Can. J. Bot.* 46: 1539-1541.
- 3) Andre, G., Moo-Young, M. and Robinson, T.M. 1981. Improved method for dynamic measurement of mass transfer for application on solid-substrate fermentation. *Biotech. Bioeng.* 23: 1611-1622.
- 4) AOAC. 1992. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, 13^a edición; Washington, D.C.
- 5) Auria, R., Palacios, J. and Revah, S. 1992. Determination of the interparticular effective diffusion coefficient for CO₂ and O₂ in solid state fermentation. *Biotech. Bioeng.* 39: 898-902.
- 6) Ausich R.L., Brinkhaus F.L., Mukharji I., Proffitt J.H., Yarger J.G., Yen H. B. 1997. Biosynthesis of zeaxanthin and glycosylated zeaxanthin in genetically engineered hosts. U.S. Patent No. 5,684,238.
- 7) Ausich R.L., Sanders D.J. 1997. Process for the formation, isolation and purification of comestible xanthophyll crystals from plants. U.S. Patent No. 5,648,564.
- 8) Barzana E., Rubio D., Santamaría R.I., García-Correa O., García F., Ridaura-Sanz V.E., López-Munguía A. 2002. "Enzyme-Mediated Solvent Extraction of Carotenoids from Marigold Flower (*Tagetes erecta*)". *J. Agric. Food Chem.* 50 (16): 4491-4496.
- 9) Cuca M.E., Pro A. 1990. "Alimentación de Aves de corral". Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- 10) Christensen F.M. 1991. Extraction by aqueous enzymatic processes. *Information* 2(11): 984-987.
- 11) Del Campo J.A., Moreno J., Vargas M.A., Guerrero M.G. 2000. "Carotenoid content of microalga: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis sp.* (Chlorophyta)". *J. Biotech.* 76(1): 51-59.

- 12) Delgado-Vargas F., Paredes-López O. 1996. "Correlation of HPLC and AOAC methods to assess the all-trans-lutein content in marigold flowers". *J. Sci. Food Agric.* 72 (3): 283-290.
- 13) Delgado-Vargas F., Paredes-López O. 1997. "Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles". *J. Agric. Food Chem.* 45 (4): 1097-1102.
- 14) DellaPenna D., Cunningham, Jr. F.X. 2001. Marigold DNA encoding beta-cyclase. U.S. Patent No. 6,232,530.
- 15) Favati F., King J.W., Friedrich J.P. 1988. "Supercritical CO₂ Extraction of Carotene and Lutein from Leaf Protein Concentrates". *J. Food Sci.* 52 (5): 1532-1536.
- 16) Fullmer L.A., Shao A. 2001. "The role of lutein in eye health and nutrition". *Am. Assoc. Cereal Chem.* 46 (9): 408-413.
- 17) Geankoplis, C. J. (ed) 1986. *Procesos de Transporte y Operaciones Unitarias*. Ed. C.E.C.S.A. México.
- 18) George, S., Raju, V., Krishnan, M.R.V., Subramanian, T.V. and Jayaraman, K. 1995. Production of protease by *Bacillus amyloliquefaciens* in solid state fermentation and its application in the unhairing of hides and skins. *Proc. Biochem.* 30: 457-462.
- 19) Gierhart D.L. 1995. Zeaxanthin-containing compositions produced by *Flavobacterium multivorum*. U.S. Patent No. 5,427,783.
- 20) Goodwin T.W. 1980. *Biochemistry of the Carotenoids*, Vol. 1: Plants-2nd. Ed. Chapman and Hall, N.Y., USA.
- 21) Gowthaman, M.K. Ghildyal, N.P. Raghava Rao, K.S.M.S. and Karant, N.G. 1993. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed bed solid state fermenters: The effect of gaseous concentrations gradients. *J. Chem. Tech. Biotech.* 56: 233-239.
- 22) Goyal A., Gosh B., Eveleigh D. 1991. "Characteristics of Fungal Cellulases". *Biores. Technol.* 36: 37-50.
- 23) Gregory G.K., Chen T.S. 1986. "Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by High Performance Liquid Chromatography". *J. Food Sci.* 52 (4): 1093-1094.

- 24) Gunasekaran, P. Augur, C. Viniegra.González, G. and Favela-Torres, E. 1996. Approaches towards improvement of strains used in solid state fermentations. In *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. Soc. Mex. Biot. Bioing. A.C. 359-364.
- 25) Hardin, M.T., Mitchell, D.A., Howes, T. 2000. Approach to designing rotating drum bioreactor for solid state fermentation on the basis of dimensionless design factor. *Biotechnol. Bioeng.* 67(3): 274-285.
- 26) Hari R.K., Patel T.R., Martín A.M. 1994. "An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry". *F. Reviews International*, 10 (1): 49-79.
- 27) Hauptmann R., Eschenfeldt W.H., English J., Brinkhaus F.L. 1997. Enhanced carotenoid accumulation in storage organs of genetically engineered plants. U.S. Patent No. 5,618,988.
- 28) Hesseltine, C.W. 1972. Biotechnology report: Solid state fermentations. *Biotechnol Bioeng.* 14: 517-532.
- 29) Hirschberg J., Harker M. 1999. Carotenoid-producing bacterial species and process for production of carotenoids using same. U.S. Patent No. 5,935,808.
- 30) Ho K.P., Tam C.Y., Zhou B. 1999. "Growth and carotenoid production of *Phaffia rhodozyma* in fed-batch cultures with different feeding methods". *Biotech Lett.* 21(2): 175-178.
- 31) Industrias Alcosa S.A. de C.V. Celaya Gto. México. 1998. Comunicación personal.
- 32) Jacobson G.K., Jolly S.O., Sedmak J.J., Skatrud T.J., Wasileski J.M. 2002. Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma* methods for their cultivation and their use in animal feeds. U.S. Patent No. 6,413,736.
- 33) Jacobson G.K., Jolly S.O., Sedmak J.J., Skatrud T.J., Wasileski J.M. 2000. "Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma* method for their cultivation and their use in animal feeds". U.S. Patent No. 6,015,684.
- 34) Kanel J.S., Marentis R.T. 2000. Process for fluid/dense gas extraction under enhanced solubility conditions. U. S. Patent No. 6,106,720.
- 35) Khachik F. 2001. Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants. U.S. Patent No. 6,262,284.

- 36) Kreienbuhl P., Rudin P., Rudolph W. 2000. Method of making carotenoids. U.S. Patent No. 6,150,561.
- 37) Lonsane, B.K., Saucedo-Castañeda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-González, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M., and Krishnaiah, M.M. 1992. Scale-up strategies for solid-state fermentation systems. *Proc. Biochem.* 27: 259-73.
- 38) Ma R.N., Chen F. 2001. Induction of astaxanthin formation by reactive oxygen species in mixotrophic culture of *Chlorococcum sp.* *Biotech. Letts*, 23 (7): 519-523.
- 39) Martínez W.L. 1979. *Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas*. Ed. Fondo de Cultura Económica, México.
- 40) Matoushek, R.F. 1974. Xanthophyllic extraction process. U.S. Patent No. 3,783,009.
- 41) Mendieta R.M., Del Amo S.R. 1981. *Plantas medicinales del estado de Yucatán*. Ed. CECSA. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos.
- 42) Mitchell, D.A., Krieger, N., Stuart D.M., Pandey, 2000. A. new developments in solid state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactor. *Proc. Biochem.* 35(10): 1211-1225.
- 43) Moo-Young, M. and Blanch, H.W. 1987. Transport phenomena and bioreactor design. En *Basic Biotechnology*. Ed. J. Bu'lock and B. Kristiansen. Academic press. London. 133-172.
- 44) Mudgett, R.E. 1980. Controlled gas environments in industrial fermentations. *Enz. Microb. Technol.* 3: 273-280.
- 45) Mudgett, R.E. 1986. Solid State fermentations. In *manual of industrial Microbiology and Biotechnology process*, eds A.L. Demain and M.A. Solomon. American Society of Microbiologists, Washington. 66-83.
- 46) Naranjo-Modad S., López-Munguía A., Vilarem G., Gaset A., Bázquez E. 2000. "Solubility of purified lutein diesters obtained from *Tagetes erecta* in supercritical CO₂ and the effect of solvent modifiers". *J. Agric. Food Chem.* 48 (11): 5640-5642.
- 47) Navarrete-Bolaños J. L., Jiménez-Islas H., Rico-Martinez R., Domínguez-Domínguez J., Regalado-González C. 2001. "A statistically based strategy for obtaining equilibrium data in xanthophylls lixiviation". *J. Food Sci.* 66 (8): 1143-1146.

- 48) Nidetzky B., Steiner W. 1993. "A New Approach for Modeling Cellulase-Cellulose Adsorption and the Kinetics of the Enzymatic Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose". *Biotech. Bioeng.* 42: 469-479.
- 49) Pandey, A. 1991. Aspects of fermenter design for solid-state fermentations. *Proc Biochem.* 26: 355-361.
- 50) Pandey, A., Zoclo, C.R., Mitchell, D. 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Proc. Biochem.* 35 (10): 1153-1169.
- 51) Quackenbush F.W., Miller S. L. 1972. "Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals". *J. Assoc. Agric. Chem.* 55: 617-621.
- 52) Raimbault, M. 1998. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron. J. Biotechnol.* ISSN 0717-3458
- 53) Rajagopalan, S. and Modak, J.M. 1994. Heat and mass transfer simulations studies for solid-state fermentation processes. *Chem. Eng. Sci.* 49: 2187-2193.
- 54) Ramana, M.M.V., Karanth, N.G. and Raghava Rao, K.S.M.S. 1993. Biochemical engineering aspects of solid-state fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 38: 99-147.
- 55) Rizvi S.S.H., Yu Z.R., Bhaskar A.R., Chidambara R.A.J. 1994. Fundamental of processing with supercritical fluids. In *Supercritical fluid processing of food and biomaterial*. St. Edmundsbury Press. Great Britain: 1-23.
- 56) Roussos, S. and Perraud-Gaime, I. 1996. Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. In *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería*. Soc. Mex. Biot. Bioing. A.C. 341-348.
- 57) Rzedowski G.C. 1985. Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN, México, D.F. Instituto de Ecología, México, D.F.
- 58) Sargantanis, J., Karim, M., Murphy, V., Ryoo, D., and Tengerdy, R. 1993. Effect of operating conditions on solid substrate fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 149-158.
- 59) Saucedo-Castaneda, G., Gutiérrez-Rojas, M., Bacquet, G., Raimbault, M., and Viniegra-Gonzalez, G. 1990. Heat transfer simulation in solid state fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 802-808.

- 60) Seddon J.M., Ajani U.A., Sperduto R.D., Hiller R., Blair N., Burton T.C., Farber M.D., Gragoudas E.S., Haller J., Miller D.T., Yannuzzi L.A., 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.
- 61) Souza, M.C.O., Roberto, I.C., Milagres, A.M. 1999. Solid state fermentation for xilanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (6): 768-772.
- 62) Sun Tao, Liu Beihui, Liu Deming and Li Zuohu. 1997. Effect of elevated temperature on *Trichoderma viride* SI-1 in Solid-State Fermentations. *Biotech Letts.* 19: 171-174.
- 63) Stewart, L. 1977. Provitamin A and Carotenoid Content of Citrus Juices. *J. Agric. Food Chem.* 25(5): 1132-1137.
- 64) Taylor R.F. 1996. "Natural Food Colorants as Nutraceuticals: Markets and Applications". *Abstracts International Congress and Symposium on Natural Colorants*, Acapulco, México.
- 65) Treybal R. E. 1995. Operaciones de Transferencia de Masa. Ed. Mc Graw-Hill.
- 66) Valadon L.R.G., Mummery R.S. 1967. "Carotenoids of certain composite flowers". *Phytochemistry.* 6: 983-988.
- 67) Van Soest P.J., Wine R.H. 1967. "Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. The determination of plant cell wall constituents". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 50: 50-56.
- 68) Van Soest P.J., Wine R.H. 1968. "The determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate". *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 51: 780-787.
- 69) Vázquez M., Martín A.M. 1998. "Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology". *Biotechnol. Bioeng.* 57 (3): 315-320.
- 70) Walker L.P., Wilson D.B. 1991. "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: an Overview". *Biores. Technol.* 36: 3-14.
- 71) Yin Jun-Jei., Subczynski W. K. 1996. Effects of lutein and cholesterol on alkyl chain bending in lipid bilayers: a pulse ESR spin labeling study. Biophysics Research Institute. Medical College of Wisconsin, USA.

- 72) Zhang X.W., Gong X.D., Chen F. 1999. "Dynamics and stability analysis of the growth and astaxanthin production system of *Haematococcus pluvialis*". *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 23: 133-137.

XII. APENDICES

APENDICE I

Identificación de bacterias.

Para la identificación de las colonias de bacterias aisladas se utilizaron los resultados en conjunto de las siguientes pruebas: tinciones de Gram, sistema API 20E, ESQUEMA DE PICKETT, ESQUEMA DE WEAVER-HOLLIS, VITTEK y SISTEMA PARA BACILOS FERMENTADORES.

Resultados de la pruebas bioquímicas; Sistema API 20 E para los microorganismos aislados del cempoalxochitl (cepas 1,2,3,4, y 5).

TEST	SUBSTRATOS	REACCIONES-ENZIMAS	C1	C2	C3	C4	C5
ONPG	Orto-nitro-fenol- β -D-galactopiranosido	Beta-galactosidasa	-	+	+	+	+
ADH	Arginina	Arginina dehidrolasa	-	-	-	-	-
LDC	Lisina	Lisina descarboxilasa	-	+	+	+	-
ODC	Ornitina	Ornitina descarboxilasa	-	-	+	+	-
CIT	Citrato sódico	Utilización del citrato	-	-	+	+	+
H ₂ S	Tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-
URE	Urea	Ureasa	-	-	-	-	-
TDA	Triptofano	Triptofnodesaminasa	-	-	-	-	+
IND	Tripofano	Producción de indol	-	-	-	-	-

VP	Piruvato sódico	Producción de acetoina	+	-	+	+	+
GEL	Gelatina de Kohn	Gelatinasa	+	+	+	-	-
Identificador	Prueba	Fermentación/oxidación	-/+	-/+	-/+	+/-	-
MAN	Manitol	"	-	-	-	+	+
INO	Inositol	"	-	-	+	+	-
SOR	Sorbitol	"	-	-	+	+	+
RHA	Ramnosa	"	-	-	-	-	+
SAC	Sacarosa	"	-/+	-/+	+	+	+
MEL	Melibiosa	"	-	-	+	+	+
AMY	Amigdalina	"	-	-	+	+	+
ARA	Arabinosa	"	-	-	+	+	+
NO ₃ - NO ₂		Producción de NO ₂	-	-	+	+	+
N ₂		Reducción a gas N ₂	+	+	-	-	-
OX	Sobre papel filtro	Citocromo oxidasa	+	+	-	-	-

Cepa No.1

Bacilo Gram negativo fusiforme.

Sistema convencional de acuerdo al esquema de Pickett: la cepa No.1 se encuentra en el grupo indol positivo.

Características primarias:

Desarrollo en agar McConkey (Bacto-McConkey DIFCO: Negativo

Prueba de oxidasa (tipibact diclorhidrato de N,N,N',N',-tetrametil-p-fenilendiamina 160 mcg/bbl) y por oxidasa Dry Slide DIFCO: Positivo dentro de los 60 segundos.

Medio movilidad-nitrato: Negativa

Características secundarias:

Pruebas de oxidación/fermentación Hugh y Leifson (Merk):

Glucosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Lactosa: oxidación negativa/fermentación negativa

Xilosa: oxidación negativa/fermentación negativa

Sacarosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Manitol: oxidación negativa/fermentación negativa

Maltosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Sistema convencional de acuerdo al esquema de Weaver-Hollis para bacilos Gram Negativos no fermentadores.

Pruebas básicas:

Prueba de oxidasa (tipibact diclorhidrato de N,N,N',N',-tetrametil-p-fenilendiamina 160 mcg/bbl) y por oxidasa Dry Slide DIFCO: Positiva dentro de los 60 segundos.

Desarrollo en agar McConkey (Bacto-McConkey DIFCO: Negativa

Motilidad directa: Negativa

Prueba de hidrólisis de esculina: Negativa

Pruebas de oxidación/fermentación Hugh y Leifson (Merk):

Glucosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Lactosa: oxidación negativa/fermentación negativa

Sacarosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Xilosa: oxidación negativa/fermentación negativa

Pruebas secundarias:

Prueba de catalasa: Positiva

Prueba de citrato de Simmons: Negativa

Prueba de indol: Positiva

TSI, slant ácido: Positiva

TSI, fondo ácido: Negativa

Sistema de identificación microbiológica VITEK

Dp 300: Negativa	Rafinosa (RAF): Negativa
Glucosa (oxidación) (OFG): Positiva	Sorbitol (SOR): Negativa
Control de crecimiento (GC): Positiva	Sacarosa (SAC): Positiva
Acetamida (ACE): Negativa	Inositol (INO): Negativa
Esculina Hidrólisis (ESC): Negativa	Adonitol (ADO): Negativa
Plan Indican (PLI): Negativa	P-Coumarico (COU): Negativa
Urea Hidrólisis (URE): Negativa	Producción de H ₂ S : Negativa
Citrato (CIT): Negativa	ONPG: Negativa
Malonato (MAL): Negativa	Ramanosa (RHA): Negativa
Triptofano (TDA): Negativa	Arabinosa (ARA): Negativa
Polimixina B (PXB): Negativa	Fermentación de glucosa: Negativa
Lactosa (LAC): Negativa	Arginina (ARG): Negativa
Maltosa (MAL): Positiva	Ornitina (ORN): Negativa
Manitol (MAN): Negativa	Oxidasa (OXI): Positiva
Xilosa (XIL): Negativa	Susceptibilidad a nobomicina

Cepa No.2

Bacilos Gram negativos cortos (cocobacilos), predominante en pares y cadenas cortas, no forman esporas. Para el algoritmo de Pickett la cepa se encuentra en el grupo oxidasa negativa; dentro del esquema de Weaver-Hollis se encuentra en el grupo oxidador de glucosa, McConkey positivo.

Esquema de PICKETT:

Características primarias:

Desarrollo en agar McConkey (Bacto-McConkey DIFCO): Positiva

Prueba de oxidasa (tipibact diclorhidrato de N,N,N',N',-tetrametil-p-fenilendiamina 160 mcg/bbl) y por oxidasa Dry Slide DIFCO: Negativa dentro de los 60 segundos.

Medio movilidad-nitrato: Negativa

Características secundarias:

Pruebas de oxidación/fermentación Hugh y Leifson (Merk):

Glucosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Lactosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Xilosa: oxidación negativa/fermentación negativa

Sacarosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Manitol: oxidación negativa/fermentación negativa

Maltosa: oxidación negativa/fermentación negativa

Sistema convencional de acuerdo al esquema de Weaver-Hollis:

Pruebas básicas:

Prueba de oxidasa (tipibact diclorhidrato de N,N,N',N',-tetrametil-p-fenilendiamina 160 mcg/bbl) y por oxidasa Dry Slide DIFCO: Negativa dentro de los 60 segundos.

Desarrollo en agar McConkey (Bacto-McConkey DIFCO: Positiva

Motilidad directa: Negativa

Prueba de hidrólisis de esculina: Negativa

Pruebas de oxidación/fermentación Hugh y Leifson (Merk):

Glucosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Lactosa: oxidación débil positiva/fermentación negativa

Sacarosa: oxidación positiva/fermentación negativa

Xilosa: oxidación negativa/fermentación negativa

Pruebas secundarias:

Prueba de catalasa: Positiva

Prueba de citrato de Simmons: Negativa

Prueba de indol: Positiva

TSI, tubo inclinado ácido: Positiva

TSI, fondo ácido: Negativa

Sistema de identificación microbiológica VITEK

1. Dp 300: Negativa	16. Rafinosa (RAF): Negativa
2. Glucosa (oxidación) (OFG): Positiva	17. Sorbitol (SOR): Negativa
3. Control de crecimiento (GC): Positiva	18. Sacarosa (SAC): Positiva
4. Acetamida (ACE): Negativa	19. Inositol (INO): Negativa
5. Esculina Hidrólisis (ESC): Negativa	20. Adonitol (ADO): Negativa
6. Plan Indican (PLI): Negativa	21. P-Cumárico (COU): Negativa
7. Urea Hidrólisis (URE): Negativa	22. Producción de H ₂ S : Negativa
8. Citrato (CIT): Negativa	23. ONPG: Positiva
9. Malonato (MAL): Negativa	24. Ramanosa (RHA): Negativa
10. Triptofano (TDA): Negativa	25. Arabinosa (ARA): Negativa
11. Polimixina B (PXB): Negativa	26. Fermentación de glucosa: Negativa
12. Lactosa (LAC): Positiva	27. Arginina (ARG): Negativa
13. Maltosa (MAL): Negativa	28. Ornitina (ORN): Negativa
14. Manitol (MAN): Negativa	29. Oxidasa (OXI): Positiva
15. Xilosa (XIL): Negativa	Resistente a penicilina

Cepa No.3

Cocobacilos y bacilos Gram negativos fermentadores, no forman esporas, facultativos, cápsula variable, catalasa positiva, reducción de nitrito variable y movilidad negativa.

Pruebas para bacilos Gram negativos para fermentadores:

TSI: K/A 24 horas: Sin producción de gas

Producción de H₂S: Negativa

Lisina descarboxilasa (LIA): Positiva

Citrato de Simmons: Negativa

MIO (Movilidad-Producción de indol_Ornitina descarboxilasa): Positivo-Negativo-Positivo.

Rojo de metilo: Positivo
Malonato: Negativo
Fermentación de glucosa: Positivo
Fermentación de xilosa: Positivo
Fermentación de sacarosa: Positivo
Fermentación de maltosa: Positivo
Fermentación de lactosa: Positivo lento
ONPG : Positivo

Cepa No.4

Cocobacilos Gram negativos fermentadores, no forman esporas, facultativos, catalasa positiva, nitrato positiva y movilidad negativa.

TSI: K/A 24 horas: Sin producción de gas

Producción de H₂S: Negativa

Lisina descarboxilasa (LIA): Positiva

Citrato de Simmons: Negativa

MIO (Movilidad-Producción de indol_Ornitina descarboxilasa): Positivo-Negativo-Positivo.

Rojo de metilo: Positivo

Malonato: Negativo

Fermentación de glucosa: Positivo

Fermentación de xilosa: Positivo

Fermentación de sacarosa: Positivo

Fermentación de maltosa: Positivo

Fermentación de lactosa: Positivo lento

ONPG: Positivo

Cepa No.5

Cocobacilos y bacilos rectos gram negativos fermentadores, no forman esporas, catalasa positiva, oxidasa positiva, movilidad positiva, reduce los nitratos.

TSI: A/A 24 horas: Sin producción de gas.

Producción de H₂S: Negativa

Lisina descarboxilasa (LIA): Positiva

Citrato de Simmons: Negativa

MIO (Movilidad-Indol producción_Ornitina descarboxilasa): Positivo-Negativo-Negativo.

Rojo de metilo: Positivo

Malonato: Negativo

Fermentación de glucosa: Positivo

Fermentación de xilosa: Positivo

Fermentación de sacarosa: Positivo

Fermentación de maltosa: Positivo

Fermentación de lactosa: Positivo

ONPG: Positivo

APENDICE II

Identificación de hongos.

En hongos, los principales criterios utilizados en su identificación fueron:

Morfología de las hifas (septadas o no septadas).

Apariencia del micelio (transparente, oscuro, coloreado o incoloro).

Presencia de esporas.

Tipo de esporas (oosporas, zigosporas o ascosporas).

Esporas sexuales: esporangiosporas, conidios, o artrosporas (oidios).

Características de la cabeza esporal: tamaño, color, forma.

Cabezales esporales que poseen conidios: conidios simples, cadenas de conidios, conidios gemantes, o acúmulos de conidios; forma y disposición de los esterigmas o fiálides; conidios unidos entre sí por una sustancia gomosa.

Aspecto de los esporangióforos o conidióforos: simples o ramificados, si son ramificados, tipo de ramificación; tamaño y forma de la columela existente en el extremo del esporangióforo; conidióforos separados o formando haces.

Existencia de estructuras especializadas: estolones, rizoides, células basales, apófisis, clamidosporas, esclerocios, etc.

Para llevar a cabo este análisis, macro y microscópico, existen varios métodos que comúnmente son utilizados, de ellos sobresale la técnica de microcultivo en portaobjeto. Esta técnica permite una identificación casi exacta de hongos, así como también resulta ser muy conveniente cuando se desean realizar preparados permanentes para futuros estudios.

APENDICE III.

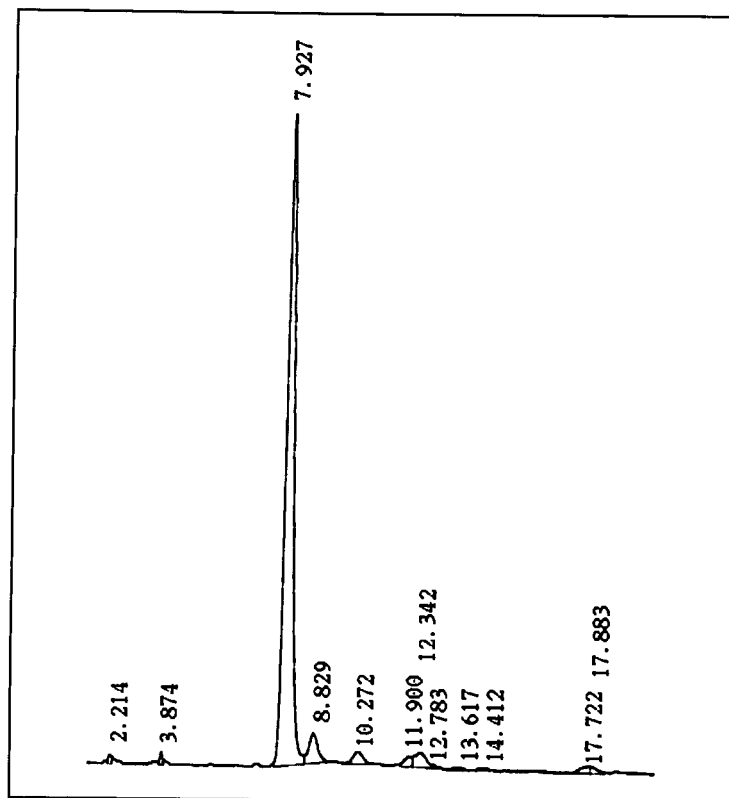
Para poder evaluar los diseños de mezclas propuestos es necesario realizar una esterilización previa del sustrato sobre el cual se tendrá la actividad microbiana a fin de evaluar, por un lado, la flora como componente puro o mezcla que se adiciona sobre el sustrato y por otro lado, que el método de esterilización empleado no provoque cambios indeseables en cuanto a la composición del sustrato. Para ambos debe de contarse con valores de referencia o testigos que permitan realizar la comparación.

Análisis de flor fresca de cempoalxochitl

Los resultados del análisis de las muestras secas obtenidas de flor fresca de cempoalxochitl muestran que la concentración de xantofilas totales que pueden ser extraídas es de 7.84 gramos por kilogramo de harina (método AOAC 970.64) y el rendimiento de la extracción con hexano es de 29.73 gramos de oleorresina por kilogramo de harina, el producto de la extracción (oleorresina) se somete a análisis por HPLC para determinar la concentración de sus componentes principales obteniéndose el perfil mostrado en la tabla y la figura siguiente.

Perfil de componentes presentes en las xantofilas totales obtenidos después de la extracción con hexano para muestra sin tratamiento.

Pico	Tiempo (min)	Concentración (%)	Componente
1	2.214	0.4411	α -caroteno
2	3.874	0.4941	β -criptoxantina
3	7.927	85.5863	Trans-luteína
4	8.829	4.5358	Trans-zeaxantina
5	10.272	2.0331	Cis-luteína-E
6	11.900	1.3303	Neoxantina
7	13.342	2.9574	No identificado
8	17.722	2.9574	No identificado



Cromatograma de HPLC del extracto de harina de flor de cempoalxochitl fresca.

El principal componente de la oleorresina obtenida de flor de cempoalxochitl es trans-luteína que se encuentra en un 85.5863% y trans-zeaxantina que se encuentra en un 4.5358% valores son similares con los publicados Quackenbush y Miller (1972); Gregory y Chen. (1986); Rivas (1989). Estos valores serán utilizados como referencia para determinar la factibilidad del proceso de esterilización, siempre y cuando los análisis muestren la formación de componentes no deseables total o parcialmente.

APENDICE IV

Estrategia de optimización experimental; Metodología de Superficie de Respuesta.

El procedimiento inicial para optimizar un proceso consiste en seleccionar un esquema experimental, el cual podría ser un diseño 2^K , 3^K , una fracción de estos o un diseño de mezclas. La selección depende de los objetivos. Con la información que se obtiene al realizar los ensayos experimentales del diseño seleccionado, se ajusta un modelo lineal de primer orden usando el método de mínimos cuadrados $[\hat{y} = \hat{\alpha} + \sum_i^k \hat{\alpha}_i x_i]$. Se prueba la hipótesis de falta de ajuste, si esta resulta significativa entonces se plantea en esta región un esquema experimental con características rotables y ortogonales que permitan la construcción de modelos de segundo orden que tiene términos cuadráticos y de interacción. En el caso de que la prueba de ajuste resulte no significativa, el modelo de primer orden se utiliza para describir una trayectoria de cambio en la variable dependiente. El algoritmo consiste en elegir un tamaño de incremento en una de las variables independientes, $[\Delta x_i]$,

e incrementar la otras variables en función de la elegida $[\Delta x_i = \frac{\hat{\alpha}_i}{\hat{\alpha}_i / \Delta x_i} \quad i=1,2,\dots,k; i \neq j]$.

Los valores obtenidos (codificados) son convertidos a variables naturales $[\Delta x_i = \frac{\Delta \xi_i}{\Delta}]$. Se realizan los ensayos experimentales con relación a la trayectoria establecida hasta observar un cambio en la tendencia de resultados (camino de la etapa ascendente o descendente). En este punto se plantea un nuevo esquema experimental tomando como centro de la región experimental la combinación de las variables que mostró el cambio de la variable dependiente. El procedimiento descrito se realiza hasta observar una falta de ajuste del modelo lineal de primer orden, dando paso a modelos de segundo orden e indicando la cercanía del óptimo. La localización del óptimo, si existe, será el conjunto de x_1, x_2, \dots, x_k , tal que las derivadas parciales $[\partial \hat{y} / \partial x_1 = \partial \hat{y} / \partial x_2 = \dots = \partial \hat{y} / \partial x_k = 0]$. Dicho punto es el punto estacionario u óptimo relativo.

APÉNDICE V.

Algoritmo de mínimos cuadrados para la construcción de modelos matemáticos a partir de esquemas experimentales.

Mínimos cuadrados incluye en el algoritmo:

- La matriz del diseño $[X]$
- El vector de respuesta $[Y]$
- Los regresores que incluirá el modelo propuesto $[\beta]$

Algoritmo:

- Definir el diseño experimental en forma de matriz. Debe tener tantas columnas como regresores incluya el modelo.
- Obtener la transpuesta de la matriz: $[X']$.
- Obtener el producto $X' * X$: $[X'X]$
- Obtener la inversa del producto $X' * X$: $[X'X]^{-1}$
- Obtener el producto de la transpuesta $[X']$ por el vector $[Y]$
- Estimar los regresores de acuerdo a $\beta = (X'X)^{-1}X'Y$

APÉNDICE VI.

Algoritmo para la solución de un sistema no lineal de n ecuaciones y n incógnitas por el método de Newton-Raphson multivariable.

Newton-Raphson incluye en el algoritmo:

- Jacobiano $[\Delta X]$
- Vector de términos independientes $[-f_i]$
- Nuevas aproximaciones a la solución $[x_{nN}]$

Algoritmo:

- Las ecuaciones quedan de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} -f_1 &= \frac{\partial f_1}{\partial x_1} \Delta x_1 + \frac{\partial f_1}{\partial x_2} \Delta x_2 + \frac{\partial f_1}{\partial x_3} \Delta x_3 + \dots + \frac{\partial f_1}{\partial x_n} \Delta x_n \\ -f_2 &= \frac{\partial f_2}{\partial x_1} \Delta x_1 + \frac{\partial f_2}{\partial x_2} \Delta x_2 + \frac{\partial f_2}{\partial x_3} \Delta x_3 + \dots + \frac{\partial f_2}{\partial x_n} \Delta x_n \\ -f_3 &= \frac{\partial f_3}{\partial x_1} \Delta x_1 + \frac{\partial f_3}{\partial x_2} \Delta x_2 + \frac{\partial f_3}{\partial x_3} \Delta x_3 + \dots + \frac{\partial f_3}{\partial x_n} \Delta x_n \\ -f_n &= \frac{\partial f_n}{\partial x_1} \Delta x_1 + \frac{\partial f_n}{\partial x_2} \Delta x_2 + \frac{\partial f_n}{\partial x_3} \Delta x_3 + \dots + \frac{\partial f_n}{\partial x_n} \Delta x_n \end{aligned}$$

- El cual se resuelve para $\Delta X_1, \Delta X_2, \Delta X_3, \dots, \Delta X_n$ requiriéndose entonces utilizar cualquiera de las técnicas para la resolución de matriz aumentada (factorización LU, Gauss-Jordan, entre otras) con la forma:

$$\left[\begin{array}{cccc|c} \frac{\partial f_1}{\partial x_1} & \frac{\partial f_1}{\partial x_2} & \frac{\partial f_1}{\partial x_3} & \frac{\partial f_1}{\partial x_n} & -f_1 \\ \frac{\partial f_2}{\partial x_1} & \frac{\partial f_2}{\partial x_2} & \frac{\partial f_2}{\partial x_3} & \frac{\partial f_2}{\partial x_n} & -f_2 \\ \frac{\partial f_3}{\partial x_1} & \frac{\partial f_3}{\partial x_2} & \frac{\partial f_3}{\partial x_3} & \frac{\partial f_3}{\partial x_n} & -f_3 \\ \frac{\partial f_n}{\partial x_1} & \frac{\partial f_n}{\partial x_2} & \frac{\partial f_n}{\partial x_3} & \frac{\partial f_n}{\partial x_n} & -f_n \end{array} \right]$$

- Donde tanto la matriz de derivadas parciales (jacobiana) como el vector de términos independientes $(-f_i)$ se evalúan en los puntos i -ésimos, es decir, se inicia un proceso iterativo con un vector propuesto.

- Posteriormente se procede a calcular las nuevas aproximaciones a la solución x_{1N} , x_{2N} , x_{3N} , ..., x_{nN} de la expresión $x_{nN} = \Delta X_n + x_n$.
- Se vuelve a resolver la matriz aumentada con este nuevo vector hasta que el error de las soluciones X_n sea mínimo.

A Statistically Based Strategy for Obtaining Equilibrium Data in Xanthophylls Lixiviation

J.L. NAVARRETE-BOLAÑOS, H. JIMÉNEZ-ISLAS, R. RICO-MARTÍNEZ, J. DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, C. REGALADO-GONZÁLEZ

ABSTRACT: The design of many separation processes is often hindered by the lack of equilibrium data. In recent years, statistically based experimental design has been successfully used to quantify relevant factors in many biological and chemical processes. We illustrate the capabilities of one of these approaches in obtaining equilibrium data for the design of lixiviation processes. The study case involves the lixiviation of marigold flower flour for xanthophylls extraction using hexane in a multistage countercurrent system. The method leads to conditions that allow the recovery of 95.3% of the pigment in seven stages.

Keywords: experimental strategy, modeling, marigold flower flour, lixiviation, equilibrium data.

Introduction

SINCE PRE-COLUMBIAN TIMES THE MARIGOLD FLOWER (*Tagetes erecta*) has played a central role in the Mexican native ceremonies honoring the dead. It has also been traditionally used for the protection of crops and as a source of color for cloths and foods such as butter and cheese (Mendietta and Del Amos 1981; Cuca and Pro 1990). Furthermore, the oleoresin pigment (xanthophylls) obtained from this flower is used in the feed supplements for poultry to improve the color of egg yolk, pigs, and fish to get their characteristic rose skin tones. These colors are quality attributes of the products, and certain levels of pigmentation are demanded by the consumer. The sales of these pigments surpass 150 million dollars per year in the United States and 100 million dollars per year in Europe (Taylor 1996; Cuca and Pro 1990). Several methods have been reported to obtain xanthophyll extracts (Delgado-Vargas and Paredes-López 1997). The most used is the lixiviation of marigold flower flour with hexane (Philip and Berry 1975; Britton 1991; Craft and Soares 1992). Commercial extraction of xanthophylls (oleoresin) from marigold flower (*Tagetes erecta*) involves the following stages: ensilage, pressing, drying, hexane extraction, and saponification. The main challenge of the extraction stage is the design of processes allowing mass transfer rates over and above what is possible with a simple stage. These designs should allow the recovery of high amounts of the products of interest without overdesigning the separation equipment and without requiring additional purification and separation stages.

There are four major elements to be established in the design of any process involving any diffusional operation: the number of equilibrium stages or their equivalent, the time of phase contact required, the permissible rate of flow, and the energy requirements (Null 1980; Treybal 1987; Geankoplis 1993).

In recent years, statistical methods have been used in many fields to quantify the relevant factors in the processes seeking to improve their efficiency (optimization). Among these methods the experimental strategy and modeling has been successfully used in biotechnology to optimize fermentative processes (Saval and others 1993; Harker and others 1995; Smith and others 1997; Vázquez and Martin 1998; Ooijkaas and others 1999), in toxicology to carry out studies

about the specific interaction between mixtures of chemical components (El-Masri and others 1997) and locate contaminant point sources (Dona 1997), in food conservation to reduce spore germination of molds (El-Halouat and Debevere 1997), and in assessing quality in processed foods (Park and others 1996). However, and in spite of the success obtained in these directions, the experimental design has had a limited application in other areas such as in improving the efficiency and design of separation processes.

Aiming to increase the efficiency of the conventional methods for extraction with solvents, the present study proposes the experimental design and statistical modeling as tools to obtain equilibrium data in lixiviation operations. Our goal is to select the appropriate extraction conditions to maximize the xanthophylls extracted from marigold flowers, and extend the reach of the design by using these conditions in a multistage countercurrent operation.

Materials and Methods

Flour: solid to leach

The biological material used in the experimental work was marigold flower flour (*Tagetes erecta*), with an average particle size of 0.372 millimeters and humidity content of 10% from Industries ALCOSA S.A de C.V., Guanajuato, Mexico. Flour from a single batch was used for all experiments. Both flour and oleoresin analyses to determine the concentration of total xanthophylls present were performed according to the AOAC 970.64 (1984) method.

Extraction of total xanthophylls

The extractions were carried out in batch processes using analytical grade hexane (J.T. Baker) under conditions based on the experimental design. When the extraction was concluded, the liquid phase was separated by centrifugation at 6000 min⁻¹ (Hermle Z383 K) and concentrated in a Büchi rotary evaporator (Model RE-111) operating at 35 °C and 50 rpm. The resulting concentrate (oleoresin) was analyzed by spectrophotometry using a Perkin-Elmer spectrophotometer (Model Lambda 20) to determine the xanthophylls concentration (AOAC 970.64 1984) and the main components profile was obtained by high performance liquid chromatography

(Gregory and Chen 1986; Delgado-Vargas and Paredes-López 1996). The leached solid was also analyzed to determine the xanthophylls concentration (AOAC 970.64 1984), and the volume of retained solvent was determined by the difference of weights on an OHAUS digital analytical scale (Explorer, precision ± 0.0001 g).

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

The equipment used for HPLC was a Varian Chromatograph Model 9050 equipped with a quaternary pump solvent delivery and degassing system, autosampler, and diode array detector. Samples consisting of 100 microliters of saponified pigment were injected. The analysis of carotenoids was performed using a silica OH column (SGE BPX5 from SGE International). The solvent elution was operated with a flow of 1.0 ml/min of a mixture containing 82.5% hexane, 1.5% isopropanol, and 14% acetone. The separation was performed at room temperature. The pigments were monitored with a 474 nm detector, time resolution 1 s, and 2 nm wavelength resolution. Peaks on chromatogram were identified by comparing their retention times. In order to obtain to the components profile the relative percentages of HPLC, chromatogram areas were used.

Experimental design

As we indicated previously, the design of processes based on diffusional forces requires one to establish the contact time, number of equilibrium stages, permissible flow rate, and energy requirements. These design constraints translate, for our purposes, in the determination of the relevance of 4 factors: (A) flour sample weight, (B) solvent volume, (C) extraction temperature, and (D) extraction time). The first 2 are related to the permissible flow rate, the 3rd relates directly to the contact time, and the 4th defines (indirectly) the energy requirements. We performed a factorial fractional experimental design (divided in half) for two levels of each factor (A: 1.0 and 2.0 g, B: 100 and 200 ml, C: 30 and 40 °C., D: 5.0 and 10.0 min.). Such design generates a factorial design 2^{4-1} . The design should serve to identify those factors (if any) that have large, little, or no effect on the response. Three additional experimental tests corresponding to the mean levels of the factors were included in order to partly account for the nonadjustable data, and allow us to calculate and estimate the prediction error of the statistical model. The adequacy of the model, obtained by least squares regression, can be checked by comparing the average response at the points in the factorial fractional portion of the design with the average response at the center points. The 11 experiments with the coded levels (-1 for the lower level, +1 for the upper level, and 0 for the mean value) are shown in Table 1.

Statistical analysis

We used ANOVA procedures with probability distribution values in the analysis of data (Statgraphics plus V 2.1 software, Manulogistics, Inc. Rockville, Md., U.S.A.). We analyzed the effects of the principal factors in the maximization of the yield of the oleoresin extraction. Data analysis using least squares allows us to construct a model that describes the relationship between the factors and the yield.

Multistage countercurrent operation; Shanks system

An efficient extraction of the pigment can only be achieved using multiple contact operations. We examine the validity of the results obtained by the experimental design on a countercurrent Shanks system. The scheme is equivalent to

Table 1—Results of the total xanthophyll extractions for each experiment.

Run No.	A	B	C	D	Xanthophyll Concentrations ^a
1	-1	+1	-1	+1	60.80
2	-1	-1	+1	+1	53.12
3	0	0	0	0	76.52
4	+1	-1	+1	-1	88.54
5	0	0	0	0	79.68
6	+1	+1	+1	+1	97.39
7	+1	-1	-1	+1	125.22
8	+1	+1	-1	-1	55.65
9	-1	-1	-1	-1	43.64
10	-1	+1	+1	-1	36.26
11	0	0	0	0	76.52

^a grams of xanthophyll/kilogram of oleoresin

the batch simulation of a multistage countercurrent operation, where the solution to be withdrawn is in contact with the freshest solid, and the fresh solvent is added to the solid from which most of the solute has already been leached (Figure 1). The system can, of course, be operated with any number of stages. Its purpose is to increase the mass transfer over and above what is possible with a single stage and obtain higher concentrations on the final product.

Results and Discussion

THE RESULTS OF THE EXPERIMENTS GENERATED FROM THE 2^{4-1} design are expressed as a function of the total extraction of xanthophylls (response variable), as it is shown in the last column of Table 1.

Statistical analysis of the process

Our main goal is to detect which factors have an important effect in increasing the yield of the xanthophylls extraction. Variance analysis is an appropriate procedure for this purpose; the results show (for a confidence interval of 0.05) that the main factors A and D are significant and, to a smaller degree, the factor B and the interaction AB+CD (see Table 2). Using Yates' algorithm (Montgomery 1997), we examined these observations and confirmed that the variable C (temperature) is not significant in determining the yield of the extraction within the range explored in our experiments. Consequently, we set this variable constant to its mean level for the remaining essays.

Regression model

With the information generated by the experiments, it is possible to describe the relationship that exists among the significant factor A, B, and D by fitting a regression-based model. The model was developed with the information

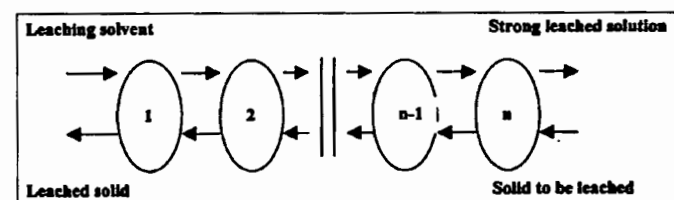


Figure 1—Schematic representation of a multistage countercurrent operation (Shanks system)

Table 2—Variance analysis for the 2⁴⁻¹ design.

Source variation	S.S.	D.F.	P.V.
Main Effects			
Factor A: weight flower	3740.26	1	0.0026
Factor B: hexane volume	456.322	1	0.0473
Factor C: temperature	12.5	1	0.6275
Factor D: time	1580.34	1	0.0090
AB + CD	465.43	1	0.0462
AC + BD	50.6018	1	0.3578
AD + BC	246.42	1	0.0967
Total error	129.248	3	
Total	6681.248	10	

R² = 98.1; standard error = 6.56374

S.S.: Sum of squares; D.F.: Degrees of freedom; P.V.: Probability distribution values.

Table 3—Model extrapolation

Flower (A) Xanthophyll (grams)	Hexane (ml)	(B) (min)	Time (D) concentrations ^b
1.5	150.0	7.5	71.635
2.2290	115.955	10.0	137.723
3.0096	72.5151	12.5	244.201
3.9439	22.7293	15.0	312.083

^b grams of xanthophyll / kilogram of oleoresin

shown in Table 1 using the transformation $X_i = (\text{factor value} - \text{mean value}) / 0.5 (\text{factor range})$. For this case, the regression model obtained using least squares is the following:

$$[\text{xanthophylls concentration}] = -8.32 + 55.71A + 0.16B - 4.06D - 0.31AB + 4.44AD$$

Here, the variables are specified in their original units. The standard error of the model is 5.95 and the correlation coefficient (R²) is 0.98

When this equation is evaluated, one obtains the results shown in Table 3. The extrapolation suggests that better extraction results can be obtained for 12.5 and 15 minutes of extraction time and flour to hexane ratios of 1:55.5 and 1:6. For each of these two groups, we set an extraction battery according to the countercurrent Shanks system (Figure 1) in seven stages operating until it reaches the steady state (Treybal 1987). At the end, the liquid phase (extract) from each stage was separated to be analyzed. The extract consists of a mixture of hexane, recovered xanthophylls, and fatty acids. The solid phase (leached flour) was also separated for analysis. It consists of a mixture of hexane, unrecovered xanthophylls, and flower flour. The extracts were concentrated on a rotary evaporator eliminating hexane until an oleoresin-type sample was obtained and the solvent was removed from the leached solids. The analysis of the phases of both sets of data [set 1: flour to hexane ratio 1:55.5 (w/v) and 12.5 minutes of residence time; set 2: flour to hexane ratio 1:6 (w/v) and 15 minutes of residence time] showed similar values of xanthophyll yields (see Table 4). However, the smaller amount of solvent used for the second set, with savings of about 89.2% of solvent with respect to the first set, makes more convenient this second group of operating values. The liquid phase of the last stage (Stage Nr 7) contains 95.3% of the original amount of xanthophylls in the marigold flower flour. The unrecovered xanthophylls quantified in the first stage represents about 2.04% of the total xanthophylls present in the flour. The mass balances applied to the system indicate that a

Table 4—Distribution of xanthophylls in each stage of the seven stage Shanks system for the first and the second set of proposed operating conditions.

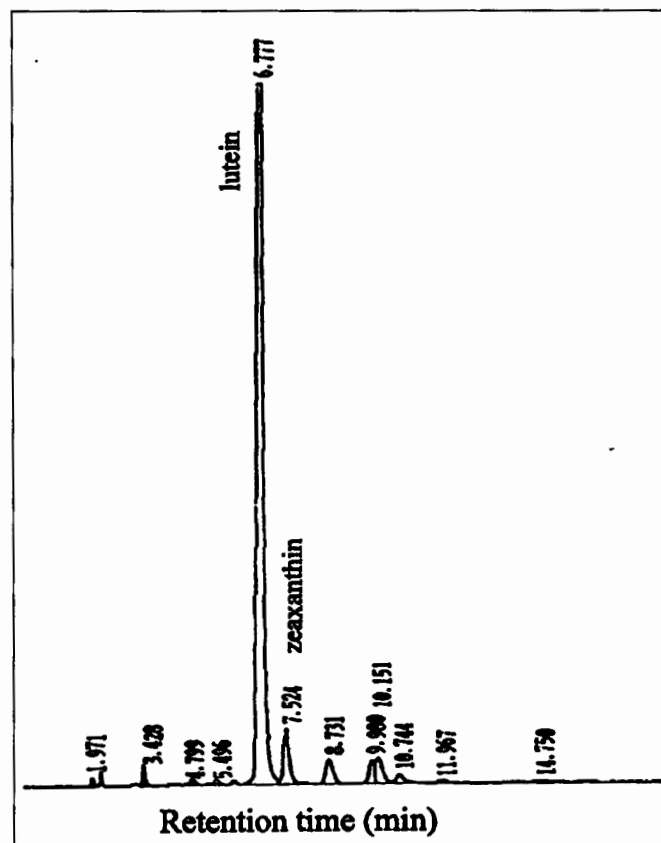
Stage No.	X ₁	Y ₁	X ₂	Y ₂
1	2.2	0.5	2.1	2.3
2	2.3	0.6	4.3	8.5
3	2.8	0.8	12.9	29.9
4	3.1	1.2	34.7	43.4
5	3.7	2.1	48.4	59.8
6	8.2	21.2	64.4	81.6
7	23.6	95.8	86.4	95.3

X₁ and X₂ = total xanthophylls percentage in solid phase in first set and second set respectively
Y₁ and Y₂ = total xanthophylls percentage in liquid phase in first set and second set respectively

loss of 2.66% of the total xanthophylls exists, due in part to the product deposited in the laboratory equipment.

Analysis of the oleoresin with High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

The extracted oleoresin was analyzed by HPLC to determine the concentration of the main components. The resulting chromatogram is shown in Figure 2. The main components are lutein (84.7%) and zeaxanthin (4.5%). These results compare favorably with those reported by Quackenbush and Miller (1972), which indicate a total content of lutein of 88%.

**Figure 2—Chromatogram for the saponified oleoresin obtained as final product from the multistage countercurrent operation**

The difference observed can be attributed to uncontrolled variables such as the variety and degree of maturity of the flower and the quantification method (Valadon and Mummery 1967; Alam and others 1968; Gregory and Chen 1986).

Based on the second set of operating values [1:6 (w/v) flour to hexane ratio] and keeping the temperature as constant (35 °C), we studied the simple-contact extraction kinetics to evaluate the change in total xanthophylls concentration in hexane and to establish the time in which the maximum extraction is achieved. The results shown in Figure 3 demonstrate that, at 15 minutes of extraction time, the maximum concentration of xanthophylls in the liquid phase is achieved. After this time, the concentration remains practically constant. This observation confirms that the values corresponding to the second set [1:6 (w/v) flour to hexane ratio and 15 minutes of residence time] are the best choice for the extraction with hexane for the experimental region examined.

Conclusions

WE HAVE ILLUSTRATED THE USE OF STRATEGIES BASED ON experimental design as tools for prediction, optimization, and design of the lixiviation process of marigold flower flour by hexane. The technique allows us to estimate conditions that lead to a maximum recovery of the lutein pigments from the flower with a minimum amount of hexane. The simple statistical tools used can be straightforwardly extended in the study of other types of systems to design the separation stages of valuable substrates from complex sources. In this type of problem, the description of the distribution of the substrate between immiscible phases is often the challenge. Such challenge is often accentuated by the lack of fundamental knowledge of the physicochemical phenomena involved in the design of the separation process. The statistical technique illustrated here could allow one to fit an empirical model to assist the design of such separation operations.

Although in our illustration we rely on the extrapolation properties of a preliminary model, this is not always possible. In the cases for which extrapolation fails, the preliminary model is only used to discard irrelevant variables and to propose a second experimental design around the predicted zone of maximum yields. In this manner, the statistical sig-

nificance of the predictions becomes more robust.

References

- Alam AU, Couch JR, Creger CR. 1968. The carotenoids of marigold *Tagetes erecta*. *Can J Bot* 46:1539-1541.
- AOAC. 1984. *Official Methods of Analysis*, 14th ed. Arlington, Va.: Association of Official Analytical Chemists.
- Britton G. 1991. Carotenoids. *Methods in plant biochemistry*. Dei Y, ed. New York: Academic Press. 7:473-518.
- Craft NE, Soares JH. 1992. Relative solubility, stability and absorptivity of lutein and beta-carotene in organic solvents. *J Agric Food Chem* 40(3):431-434.
- Cuca ME, Pro A. 1990. Alimentación de aves. Colegio de Postgraduados, Chapinigo, México. [In Spanish].
- Delgado-Vargas E, Paredes-López O. 1996. Correlation of HPLC and AOAC methods to assess the all-trans-lutein content in marigold flowers. *J Sci Food Agric* 72(3):283-290.
- Delgado-Vargas E, Paredes-López O. 1997. Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles. *J Agric Food Chem* 45(4):1097-1102.
- Dona OJ. 1997. Response surface methodology: An analytical method for locating migrated contaminant sources. Air Force Inst Tech School Eng Govt. Reports Announcements and Index. Issue 16.
- El-Masri HA, Reardon KF, Yang RS. 1997. Integrated approaches for the analysis of toxicologic interactions of chemical mixtures. *Crit Rev Tox* 27:175-197.
- El-Halouat A, Debevere, JM. 1997. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of molds isolated from prunes. *Int J Food Microbiol* 35:41-48.
- Geankoplis CJ. 1993. *Process transport and unit operations*. 3th ed. USA: Prentice-Hall, Inc. p 801-815.
- Gregory GK, Chen TS. 1986. Quantitative analysis of lutein esters in marigold flowers (*Tagetes erecta*) by high performance liquid chromatography. *J Food Sci* 52(4):1093-1094.
- Harker M, Tsavalos AJ, Young AJ. 1995. Use of response surface methodology to optimize carotenogenesis in the microalga *Haematococcus pluvialis*. *J Appl Phycol* 7:399-406.
- Mendieta RM, Del Amos SR. 1981. *Plantas medicinales del estado de Yucatán*. Ed. CECSA. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. México [in Spanish].
- Montgomery DC. 1997. *Design and analysis of experiments*. 4th ed. USA: John Wiley & Sons, Inc. p 575-579.
- Null RH. 1980. *Phase equilibrium in process design*. 1st ed. Huntington, N.Y.: Krieger Publishing Company p 15-50.
- Ooijkaas LP, Wilkinson EC, Trammer J, Buitelaar MR. 1999. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically-based experimental designs. *Biotechnol and Bioeng* 64:92-100.
- Park JW, Testin RF, Vergano PJ, Park HJ, Weller CL. 1996. Application of laminated edible films to potato chip packaging. *J Food Sci* 61(4):766-768.
- Philip T, Berry JW. 1975. A process for the purification of lutein-fatty from marigold petals. *J Food Sci* 41:163-165.
- Quackenbush FW, Miller SL. 1972. Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals. *J Assoc Agric Chem* 55(3):617-621.
- Saval S, Pablos L, Sánchez S. 1993. Optimization of a culture medium for streptomycin production using response-surface-methodology. *Bioresource Tech* 43:19-25.
- Smith NK, Gilmour SG, Rastall RA. 1997. Statistical optimization of enzymatic synthesis of derivatives of trehalose and sucrose. *Enzyme and Microbial Techn* 21:349-354.
- Taylor RF. 1996. Natural food colorants as nutraceuticals: Markets and applications. In: *Abstracts International Congress and Symposium on Natural Colorants*. Acapulco, México. 3 p.
- Treybal RE. 1987. *Mass-transfer operations*. 3th ed. USA: McGraw-Hill Inc. p 717-744.
- Valadon LR, Mummery RS. 1967. Carotenoids of certain composite flowers. *Phytochem* 6:983-988.
- Vázquez M, Martín, AM. 1998. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnol and Bioeng* 57:314-320.
- MS 20000118

The authors gratefully acknowledge financial support by the Sistema de Investigación Miguel Hidalgo (SIHGO) and the Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (COSNET), and technical assistance by Benjamín Quezada-Zavala, Nelzer Martínez-Abarca, Luis Miguel González-Calderón, and Rosa Martha Figueroa-Vizcafo.

Authors Navarrete-Bolanos, Jimenez-Islas, and Rico-Martinez are with the Depto. de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico s/n, C.P. 38010, Celaya, Gto. México; Domínguez-Domínguez is with the Centro de Investigación en Matemáticas, Guanajuato, México; and Regalado-Gonzalez with the Universidad Autónoma de Querétaro, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (PROPAC), México. Direct inquiries to author Navarrete-Bolanos (E-mail: jlnb@itc.mx).

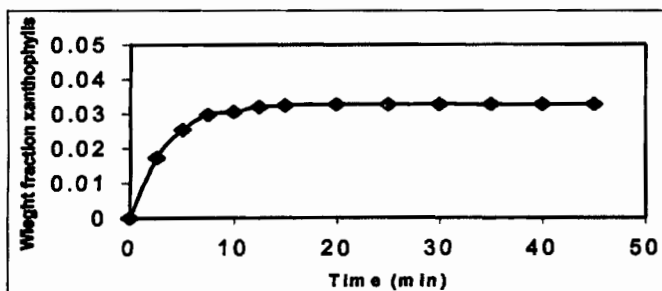


Figure 3—Extraction rate of xanthophylls in hexane corresponding to the following extraction conditions: 1:6 (w/v) flour to hexane ratio, 15 minutes residence time and temperature at 35 °C.

Application of the Response Surface Methodology for the Design of a Lixiviation Process

José Luis Navarrete-Bolaños,^{*,†,‡} Hugo Jiménez-Islas,[†] Enrique Botello-Alvarez,[†] and Ramiro Rico-Martínez^{†,‡}

Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico s/n, C.P. 38010. Celaya, Gto., México, and Universidad Autónoma de Querétaro, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (PROPAC), Cerro de las Campanas s/n, C.P. 76010. Querétaro, Qro., México

Abstract:

The design of many separation processes is often hindered by the lack of distribution data between two immiscible phases. Inappropriate or partial designs result in inefficiencies that translate into poor recovery of the products, oversized separation equipment, or additional purification and separation stages. In recent years, statistically based experimental design has been successfully used to quantify relevant factors in many biological and chemical processes. In this study, we illustrate the capabilities of one of these approaches, the response surface methodology (RSM) for the optimization of lixiviation processes of marigold flower flour for xanthophyll extraction (oleoresin) using hexane. The method leads to conditions for the maximum recovery of the pigment, allowing the determination of the optimal residence time (14.7 min) and flour-to-solvent ratio (1:5) at 35 °C. These values can be used in the lixiviation process in any operation mode. In this study, we illustrate the use of a countercurrent process that allows recovery of 97.5% of the oleoresin.

Introduction

The most efficient way to produce many chemical products is to extract them from natural sources. The challenge faced by scientists and engineers is then to develop the separation methods necessary to isolate and purify such products. The separation processes most commonly used in the Biochemical and Chemical industries can be divided into physical, equilibrium-controlled, and rate-controlled separations. While, in general, clear guidelines to select the most appropriate type of process and identify the relevant operating parameters for a given separation are available, the design of the separation process is often hindered by the lack of accurate distribution data. A good prediction of the equilibrium for a given system may allow the recovery of high proportion of the main products, avoiding inappropriate or partial design of the separation train. On the other hand, inaccurate data may result in inefficiencies that translate into poor recovery of the products, oversized separations equipment, or additional purification and separations stages. In some cases, the cost of the final product may be doubled because of deficiencies in the separation stages, and one may

face recoveries that barely reach 50% of the main product in the original raw materials.

For complex systems, such as the ones formed by substrates directly obtained from natural sources, predicting the distribution of a substance between two immiscible, or partially immiscible phases, is not an easy task. The current engineering practice relies mainly in experimental measurements of the distribution data. However, the inherent nonlinear (nonideal) behavior of such systems often brings about the need for a large number of experiments to achieve reasonable inter- and extrapolations of the experimental data distribution. Under these circumstances, it is desirable to take advantage of experimental strategies based on statistical techniques to minimize the number of experiments required to achieve an accurate description of the equilibrium between phases. Moreover, if these techniques can be used to predict the conditions of maximum recovery, the data thus gathered will be more accurate, precisely for the more relevant experimental conditions. One of such strategies is the response surface methodology (RSM). This methodology comprises a group of statistical techniques for empirical model building and model exploitation. The RSM seeks, via a careful design and analysis of experiments, to relate a response, or output variable, to the levels of a number of parameters, or input variables, that affect such response. The RSM has been used in many fields to improve the efficiency of many processes and optimize design variables.^{1–9} However, and despite the success obtained for these applications,

- (1) Saval, S.; Pablos, L.; Sánchez, S. Optimization of a culture medium for streptomycin production using response-surface-methodology. *Bioresour. Technol.* 1993, 43, 19–25.
- (2) Harker, M.; Tsavalos, A. J.; Young, A. J. Use of response surface methodology to optimize carotenogenesis in the microalga *Haematococcus pluvialis*. *J. Appl. Phycol.* 1995, 7, 399–406.
- (3) Park, J. W.; Testin, R. F.; Vergano, P. J.; Park, H. J.; Weller, C. L. Application of laminated edible films to potato chip packaging. *J. Food Sci.* 1996, 61, 766–768.
- (4) Smith, N. K.; Gilmour, S. G.; Rastall, R. A. Statistical optimization of enzymatic synthesis of derivatives of trehalose and sucrose. *Enzyme Microb. Technol.* 1997, 21, 349–354.
- (5) Dona, O. J. Response Surface Methodology: An Analytical Method for Locating Migrated Contaminant Sources. In *Government Reports Announcements and Index*; Air Force Institute of Technology, School of Engineering: Washington, DC, 1997; Issue 16.
- (6) El-Masri, H. A.; Reardon, K. F.; Yang, R. S. Integrated approaches for the analysis of toxicologic interactions of chemical mixtures. *Crit. Rev. Toxicol.* 1997, 27, 175–197.
- (7) El-Halouat, A.; Debevere, J. M. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 35, 41–48.
- (8) Vázquez, M.; Martín, A. M. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 57, 314–320.

* Author to whom correspondence may be sent. Telephone: (+52) 461 61 1 75 75. Fax: (+52) 461 61 1 79 79. E-mail: jlnb@itc.mx.

[†] Instituto Tecnológico de Celaya.

[‡] Universidad Autónoma de Querétaro.

the RSM has had limited application in other areas, such as in improving the efficiency and design of separation processes. In this contribution, we illustrate the application of the RSM in the design of separation processes using as the model system a colorant extraction from natural sources. The design goal is to establish the optimum value of the operating variables that could be used in the most common modes of the separation equipment operation: batch and continuous, concurrent and countercurrent contacting. In previous work¹⁰ we described a statistically based strategy seeking to achieve the design goal from a single experimental design. Such an approach may prove to be inaccurate and to lack robustness since it is based on extrapolations of a fitted model. In this contribution, we proposed a refinement of this original approach, consisting of two-tier strategy. The initial experimental strategy is used to construct a low-order model that predicts the region of maximum yield. Using this prediction we devise a second experimental design that, statistically, allows a higher-order (and thus more accurate) description of the separation process. The robustness of the obtained result is examined by looking at the agreement between the two approximations. For our model system, the separation process involves the lixiviation (extraction via dissolution in a liquid solvent) of marigold flower flour with hexane.¹⁰⁻¹³ The oleoresin pigment (xanthophylls) obtained from this extraction process is used commercially as an additive to poultry feed. In addition, some xanthophylls had demonstrated properties as cancer prevention agents, ligament repair in muscular tissue, aid in enzyme transport, and a prevention agent for age-related macular degeneration.^{14,15} These properties have sparked a renewed interest to develop and improve the xanthophylls' extraction methods to increase yield extraction.

Materials and Methods

Flour: Solid to Leach. The material used in the experiments was marigold flower flour (*Tagetes erecta*) with an average particle size of 0.372 mm and humidity content of 10% from Industries ALCOSA S.A de C. V., Guanajuato, Mexico. Flour from a single batch was used for all experiments. Both flour and oleoresin analyses to determine the total concentration of xanthophylls present in the samples

were performed according to the AOAC 970.64 (1984) method.¹⁶ All experiments were replicated.

Extraction and Quantification of Total Xanthophyll.

The extractions were carried out in batch processes using analytical grade hexane (J. T. Baker) under conditions based in an experimental design. When the extraction was concluded, both phases (light and heavy) were separated.¹⁰ The light phase (liquid) was concentrated and analyzed to determine the xanthophylls concentration⁶ and the main components profile was obtained by high performance liquid chromatography.¹⁰ The heavy phase (solid) was desolventized, and the retained solvent volume was determined by difference of weights on an OHAUS digital analytical scale (Explorer, precision ± 0.0001 g). Solid free solvent was also analyzed to determine the xanthophylls concentration.¹⁶

Experimental Design

There are four major elements to be established in the design of processes based on diffusional forces: the number of equilibrium stages or their equivalent, the time of phase contact required, the permissible rate of flow, and the energy requirements.¹⁷⁻¹⁸ These design constraints translate, for our purposes, into the determination of the relevance of four factors: (A) flour sample weight, (B) solvent volume, (C) extraction temperature, and (D) extraction time. The first two are related to the permissible flow rate, the fourth relates directly to the contact time, and the third defines (indirectly) the energy requirements. We performed a factorial fractional experimental design (divided in half) for two levels of each factor (A: 1.0 and 2.0 g, B: 100 and 200 mL, C: 30 and 40 °C., D: 5.0 and 10.0 min.), resulting in a 2^{4-1} factorial design. Under the fractional design one should add experimental tests corresponding to the mean levels of the factors to account for nonadjustable data and allow us to calculate and estimate the prediction error of the statistical model. In our case we added three additional experiments at these mean levels. A fractional factorial design can be interpreted graphically as depicted in Figure 1. The experimental points are located at the corners and center of the cube in the lower left corner. The points in the center correspond to the experiments with the mean values of the factors. The coded values of the factors for the 11 experiments (-1 for the lower level, +1 for the upper level, and 0 for the mean value) are shown in Table 1.

The results from this initial design are used as the basis to predict the factor levels for which one will obtain the largest response value. Using this prediction, we devised a second experimental design to reach a more accurate dependence of the response variable with respect to each factor level. This complementary strategy takes the form of a second-order composite design that has characteristics of rotatability and orthogonality and results very efficiently in the number of runs required. Similar experimental designs

- (9) Ooijkaas, L. P.; Wilkinson, E. C.; Tramper, J.; Buitelaar, M. R. Medium optimization for spore production of *Coniothyrium minitans* using statistically based experimental designs. *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 64, 92-100.
- (10) Navarrete-Bolaños, J. L.; Jiménez-Islas, H.; Rico-Martínez, R.; Domínguez-Domínguez, J.; Regalado-González, C. A statistically based strategy for obtaining equilibrium data in xanthophylls lixiviation. *J. Food Sci.* 2001, 66, 1143-1146.
- (11) Philip, T.; Berry, J. W. A process for the purification of lutein-fatty from marigold petals. *J. Food Sci.* 1975, 41, 163-165.
- (12) Britton, G. Carotenoids. *Methods Plant Biochem.* 1991, 7, 473-518.
- (13) Craft, N. E.; Soares, J. H., Jr. Relative Solubility, Stability and Absorptivity of Lutein and Beta-Carotene in Organic Solvents. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 431-434.
- (14) Taylor, R. F. Natural Food Colorants as Nutraceuticals: Markets and Applications. In *Abstracts International Congress and Symposium on Natural Colorants*; Acapulco, México, 1996.
- (15) Seddon, J. M.; Ajani, U. A.; Sperduto, R. D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T. C.; Farber, M. D.; Gragoudas, E. S.; Haller, J.; Miller, D. T.; Yannuzzi, L. A.; Willett, W. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. A multicenter study. *J. Am. Med. Assoc.* 1994, 272, 1413-1420.

- (16) AOAC. *Official Methods of Analysis*, 14th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC, 1984.
- (17) Treybal, R. E. *Mass-Transfer Operations*, 3rd ed.; McGraw-Hill Inc.: New York, 1987.
- (18) Geankoplis, C. J. *Process Transport and Unit Operations*; 3rd ed.; Prentice-Hall: New York, 1993.

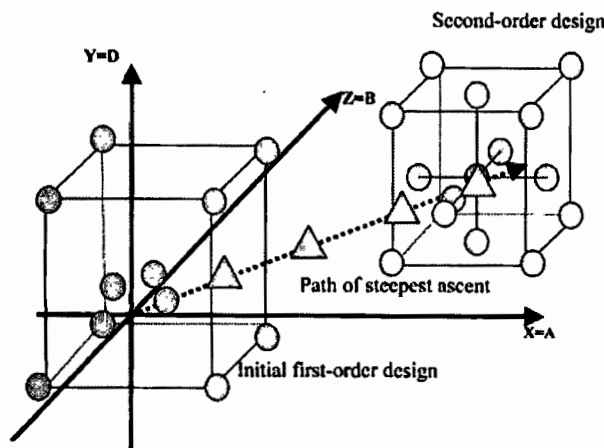


Figure 1. Graphical representation of the response surface methodology. It includes the first factorial design, the extrapolation given by the steepest ascent path, along with the factorial design for the new search region (second order design).

Table 1. Coded levels for the 11 experiments generated by the initial experimental design with their corresponding response value (total xanthophyll extracted)

run	A (flour)	B (solvent)	C (temperature)	D (time)	xanthophyll concentrations ^a
1	-1	+1	-1	+1	60.80
2	-1	-1	+1	+1	53.12
3	0	0	0	0	76.52
4	+1	-1	+1	-1	88.54
5	0	0	0	0	79.68
6	+1	+1	+1	+1	97.39
7	+1	-1	-1	+1	125.22
8	+1	+1	-1	-1	55.65
9	-1	-1	-1	-1	43.64
10	-1	+1	+1	-1	36.26
11	0	0	0	0	76.52

^a Grams of xanthophyll/kilogram of oleoresin.

were originally proposed by Box and Behnken in 1960.¹⁹

Statistical Analysis. We used ANOVA procedures with probability distribution values in the analysis of data (Statgraphics plus V 2.1 software). We analyzed the effects of the principal factors in the maximization of the yield of the oleoresin extraction. Data analysis using least-squares allows us to construct a model that describes the relationship between the factors and the yield.

Multistage Countercurrent Operation-Shanks System.

An efficient extraction of the pigment can only be achieved using multiple contact operations. We examine the validity of the results obtained by the RSM methodology on a multistage countercurrent operation, where the solution to be withdrawn is in contact with the freshest solid and the fresh solvent is added to the solid from which most of the solute has already been leached. The system can, of course, be operated with any number of stages. Its purpose is to increase the mass transfer over and above what is possible with a single stage and obtain higher concentrations on the final product.

(19) Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, 4th ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 1997.

Table 2. Analysis of variance to the first-order model^a

source variation	S.S.	D.V.	P.V.
model	5776.77	3	0.002
residual	904.13	7	
total	6680.90	10	

^a $R^2 = 86.467$; standard error = 11.367. S.S. = sum of squares; D.F. = degrees of freedom; P.V. = probability distribution values.

Table 3. Points on the path of steepest ascent

run	coded conditions			flower flour (g)	hexane (ml)	time (min)	[X _T] g/kg
	A	B	D				
3,5,11	0	0	0	1.5	150	7.5	72.12
12	1.53	-0.68	1.0	2.26	123.5	10.0	92.93
13	3.12	-1.56	2.0	3.06	71.5	12.5	102.86
14	4.78	-2.57	3.0	3.89	20.65	15.0	125.49
15	6.51	-3.68	4.0	4.71	-32.58	17.5	---

Results and Discussion

The results of the experiments generated from the 2^{4-1} design are expressed as a function of the total extraction of xanthophyll (response variable), as shown in the last column of Table 1. The variance analysis show (for a confidence interval of 0.05) that the main factors *A* and *D* are significant, and in a smaller degree, the factor *B* and the interaction $AB = CD$.¹⁰ Using Yates' algorithm¹⁹ it can be shown that the variable *C* (temperature) is not significant in determining the yield of the extraction within the range explored in our experiments. Consequently, we set this variable constant to its mean level for the remaining essays. With this information, it is possible to describe the relationship that exists among the significant factors *A*, *B*, and *D* by constructing a regression-based polynomial model using least-squares. For this case, the regression model obtained is the following:

$$[\text{xanthophyll concentration}] = 72.12 + 21.62A - 7.55B + 14.05D$$

Here, the variables are specified in their coded units. The standard error of the model is 11.367, and the correlation coefficient (R^2) is 86.467. In this equation one implicitly assumes that the dependence of the response variable with respect to the factors is linear and that the effects of these factors are additive. The analysis of variance (Table 2) shows no reason to question the adequacy of these assumptions under a statistical basis.

The results of this initial design are shown graphically in Figure 1, along with the fitted first-order model. The model can be tentatively accepted as a rough geometrical representation of the underlying response function over the experimental region explored thus far. Using this model, we search for the region for which the xanthophyll extraction will be maximized, following the path of steepest ascent, perpendicular to the contour lines, indicated by triangles in Figure 1. A convenient set of points of the steepest ascent path is shown in Table 3. The proposed ascent path suggests conditions (run 14 in Table 3) giving the best yield. Additional points beyond run 14 will not be feasible because

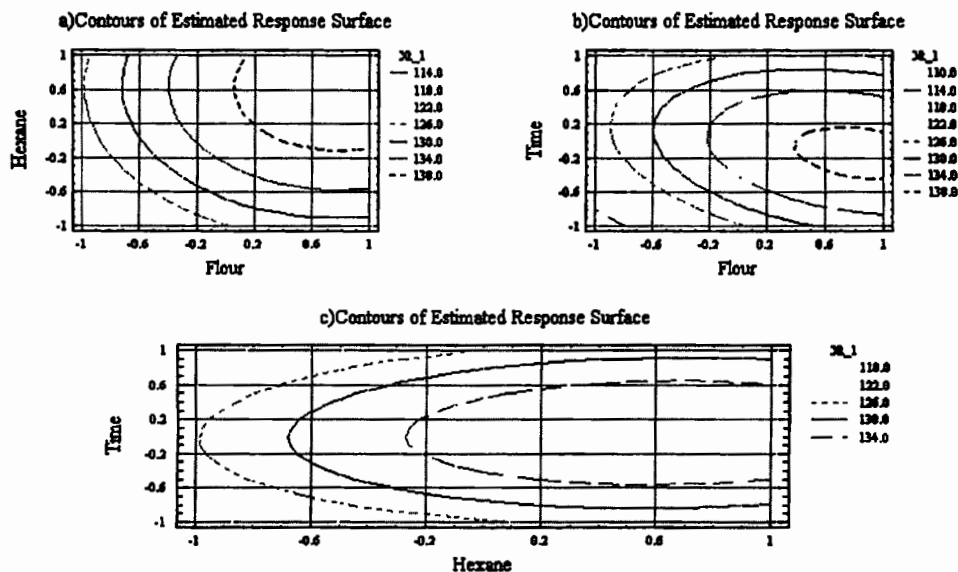


Figure 2. Plots of response for the operating variables analysis showing an optimum point.

Table 4. Box–Behnken design and data obtained from experimental runs

run	A (flour)	B (hexane)	D (time)	xanthophyll concentrations ^a
1	-1	-1	0	114.98
2	-1	+1	0	118.84
3	+1	-1	0	134.18
4	+1	+1	0	138.68
5	-1	0	-1	113.7
6	-1	0	+1	119.7
7	+1	0	-1	130.2
8	+1	0	+1	121.7
9	0	-1	-1	111.74
10	0	-1	+1	112.82
11	0	+1	-1	128.76
12	0	+1	+1	132.76
13	0	0	0	135.74
14	0	0	0	133.98
15	0	0	0	137.8

^a Grams of xanthophyll/kilogram of oleoresin.

the solvent volume is reduced to zero (run 15). Graphs of these results suggest that subsequent experiment should be made in the neighborhood of run 14. In this point a new (Box–Behnken) design was made (Table 4) using the levels of the three remaining main variables suggested by the first design and the steepest ascent path (A : 3 and 5 g, B : 16 and 26 mL, D : 12.5 and 17.5 min). Since one would expect that the region described by these new experiments will contain the optimum of the xanthophyll extraction, we set a design that will allow us to describe the system via at least a second-order model to achieve better accuracy.

$$[\text{xanthophyll concentration}] = 135.84 + 7.30A + 5.60B + 0.35D - 4.66A^2 - 4.41B^2 - 9.98D^2 - 0.028AB - 3.75AD + 0.79BD$$

This description was once again obtained via least-squares from the 15 experimental runs of the Box–Behnken design. The model was also used to construct response plots (Figure

2a, b, and c). These plots hint at the presence of a global optimum, a set of operating conditions on the three variables, that leads to maximum xanthophyll extraction. The location of the optimum becomes a simple example of locating an extremum for a multidimensional system via derivation of the second-order model and solution of the resulting set of linear equations:

$$\frac{\partial[X_i]}{\partial A} = 7.30 - (2)4.66A - 0.028B - 3.75D = 0$$

$$\frac{\partial[X_i]}{\partial B} = 5.60 - 0.028A - (2)4.41B + 0.79D = 0$$

$$\frac{\partial[X_i]}{\partial D} = 0.35 - 3.75A + 0.79B - (2)9.98D = 0$$

The system solution shows the following result: $A = 0.83$, $B = 0.62$, and $D = -0.11$ as optimum values for the extraction. Using the transformation ($X_i = \text{optimum factor value} + (\text{factor upper bound} - \text{factor lower bound})/2$) + mean factor value) one obtains the decoded factor values. This procedure indicates that the extraction should take place allowing for 14.7 min residence time and handling a flour-to-hexane ratio of 1:5 (see Figure 2 a, b, and c) to maximize the pigment extraction. A verification run around these conditions gives a response of 138.28 g/kg of xanthophyll extracted which compares favorably against the predicted model value of 140.58 g/kg.

Countercurrent Extraction. Using these conditions, we set an extraction battery in countercurrent operation in nine stages until the steady state was reached.¹⁷ At the end, the liquid phase (extract) and the solid phase (leached flour) were separated for analysis from each stage. The extract consists of a mixture of hexane, recovered xanthophyll, and fatty acids. The leached flour consists of a mixture of hexane, unrecovered xanthophyll, and flower flour. The extracts were concentrated on a rotary evaporator, eliminating hexane until an oleoresin-type sample was obtained and the solvent was removed from the leached solids. The analysis of the liquid-

Table 5. Distribution of xanthophyll in each stage for the Shanks system^a

stage	X	Y
1	1.55	0.41
2	1.98	1.12
3	2.03	2.04
4	4.32	8.49
5	12.8	19.95
6	22.7	28.87
7	34.8	47.62
8	48.4	70.67
9	72.3	97.5

^aX = total xanthophyll percentage in solid phase. Y = total xanthophyll percentage in liquid phase.

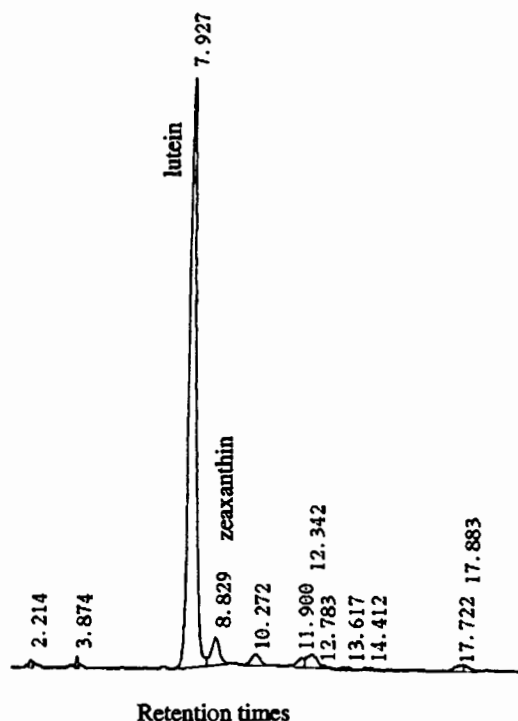


Figure 3. Chromatograph of HPLC for the saponified oleoresin obtained as final product from the multistage countercurrent operation.

phase concentrate of the last stage (stage 9) reveals that 97.5% of the original amount of xanthophyll contained in the marigold flower flour is recovered (Table 5). The unrecovered xanthophyll quantified in the first stage represents about 1.55% of the total xanthophyll present in the flour. The mass balances applied to the system indicate a loss of 0.95% of the total xanthophyll due in part to the product deposited in the laboratory equipment.

Analysis of the Oleoresin with High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The extracted oleoresin, obtained in the stage 9, was analyzed by HPLC to determine the concentration of their main components. The resulting profile is shown in Figure 3. The main components are lutein (85.59%) and zeaxanthin (4.54%). They indicate that the concentrations of the original components are conserved and can be compared favorably with those reported previously.^{10,20}

Pre-design Xanthophyll Extraction Process. Our results allow the pre-design of a xanthophyll lixiviation plant for processing marigold flowers flour. They indicate that with the use of a countercurrent system with nine stages the expected recovery is 97.5%. The system should be operated with a 1:5 flour-to-hexane ratio, phase contact time of 14.7 min, and operation temperature of 35 °C. The conditions cited are the basis to determine the equipment cross-sectional area and energy requirements for operation. Such determinations should take into account the stage efficiency and should guarantee high recovery yields and absence of unwanted changes in the final products.

Conclusions

The analysis presented here demonstrates the application of RSM as a robust tool for optimization of the lixiviation process of marigold flower flour. At the core of this work lies the issue of selecting a set of basis points for the construction of a regression-based model that reproduces the dependence of the "response" of the system with respect to the operating variables. The RSM seeks to address this problem by choosing points that lie in regions associated with high probability. In our illustration, the high yield output obtained shows good convergence and robustness properties. Furthermore, different order approximations are obtained from model outputs from different sampling points, and the agreement between successive order approximations is a strong indicator of a good fit. In our illustration, the agreement in the order of magnitude and relevant factor values predicted by the two successive models confirm that the obtained conditions are nearly optimum in a statistical sense. Alternatively, one could use a random choice of experimental points from the entire set of possible experimental conditions, which could lead to poor estimates of the yields of the output values. The RSM, however, presents some limitations. If the probability distributions of the inputs exhibit strong discontinuities, the probability density estimates using RSM are likely not to converge.

The RSM is, in general, useful to address uncertainty analysis of complicated models in many engineering fields. It represents a potentially valuable alternative to the currently prevalent methods of uncertainty analysis that are computationally prohibitive for complex systems.

The use of regression models based on experimental data to describe physicochemical phenomena should be examined carefully. The resulting models could be inaccurate because of experimental errors and a poor selection of "relevant factors" and their operation values. Under these circumstances, the prediction of "optimal" conditions via extrapolation of the models should always be tested. The use of RMS strategy illustrated here provides an alternative to overcome these concerns.

The two-tier strategy illustrated here leads to improved extraction conditions that require 16% less solvent and results in 2% higher purity of the recovered pigment with respect

(20) Quackenbush, F. W.; Miller, S. L. Composition and analysis of the carotenoids in marigold petals. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 1972, 55, 617-621.

to the cases for which only a single experimental design is used.¹⁰ While these improvements may appear small, they can be important in determining the economical feasibility of the process.

When the amount of solvent per unit of feed is fixed, the number of stages required decreases as solvent rate or solvent-to-solid ratio increases. Since the capacity of the equipment for handling the larger liquid flow must at the same time increase, the cost of equipment must then pass through a minimum. The extracts solutions become more dilute as solvent rate is increased; consequently, the cost of solvent removed increases. The total cost, which is the sum of fixed and operation costs, reaches a minimum at the optimum value of the operation variables.

The response surface methodology is mainly applied to laboratory or pilot-plant operations. However, the condition that was optimum to these levels may not be optimum for the full-scale process. This "scale-up" usually results in distortion of the optimum conditions. Even if the full-scale

plant begins operation at the optimum; it will eventually "drift" away due to changes in raw materials, environmental regulations, equipment, and operating personnel. Thus, full-scale processes are also susceptible of profiting from the use of RSM.

The RSM technique can be straightforwardly extended in the study of other types of separations used in biochemical or chemical processes whenever the data distribution between phases cannot be described from fundamental principles.

Acknowledgment

We gratefully acknowledge financial support by the Sistema de Investigación Miguel Hidalgo (SHIGO) and the Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (COSNET).

Received for review May 27, 2002.

OP0255534

Mixed Culture Optimization for Marigold Flower Ensilage via Experimental Design and Response Surface Methodology

JOSÉ LUIS NAVARRETE-BOLAÑOS,^{*,†,‡} HUGO JIMÉNEZ-ISLAS,[†]
ENRIQUE BOTELLO-ALVAREZ,[†] AND RAMIRO RICO-MARTÍNEZ^{†,‡}

Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Ave. Tecnológico s/n, C.P. 38010. Celaya, Gto., México, and Universidad Autónoma de Querétaro, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (PROPAC), Cerro de las Campanas s/n, C.P. 76010, Querétaro, Qro., México

Endogenous microorganisms isolated from the marigold flower (*Tagetes erecta*) were studied to understand the events taking place during its ensilage. Studies of the cellulase enzymatic activity and the ensilage process were undertaken. In both studies, the use of approximate second-order models and multiple lineal regression, within the context of an experimental mixture design using the response surface methodology as optimization strategy, determined that the microorganisms *Flavobacterium llb*, *Acinetobacter anitratus*, and *Rhizopus nigricans* are the most significant in marigold flower ensilage and exhibit high cellulase activity. A mixed culture comprised of 9.8% *Flavobacterium llb*, 41% *A. anitratus*, and 49.2% *R. nigricans* used during ensilage resulted in an increased yield of total xanthophylls extracted of 24.94 g/kg of dry weight compared with 12.92 for the uninoculated control ensilage.

KEYWORDS: Marigold flower; ensilage; starter inoculum; mixed culture

INTRODUCTION

The oleoresin obtained from marigold flower (*Tagetes erecta*) is used commercially as an additive to poultry feed to improve the birds' nutrition and the pigmentation of their skin and egg yolks. A bright yellow color is often associated with good health and premium quality by the consumer (1, 2). Carotenoids, in particular lutein, the main oleoresin component, has demonstrated properties as an anticarcinogen, as an agent to facilitate ligament repair, as an aid in enzyme transport, and as a preventative agent for age-related macular degeneration (AMD), a leading cause of visual problems in the elderly (3, 4). These properties have sparked renewed interest in the development of alternative production routes for carotenoid pigments such as chemical synthesis (5) and fermentation technology (6–8). Complementary efforts have been directed toward increasing the extraction yield from marigold flower flour using supercritical fluid extraction (9) and enzymatic preparations (10). In broad terms, the commercial extraction of oleoresin from marigold flower consists of five stages: ensilage, pressing, drying, hexane extraction, and saponification. Ensilage efficiency has been identified as the main factor hindering industrial recovery of xanthophylls via solvent extraction (Alcosa S. A., Celaya, Gto. México). In this stage, the microorganisms associated with the marigold flower degrade the cellulose and

hemicellulose present in the cell walls of the flower petals. This degradation increases the mass exchange between solvent and solid in the extraction process.

In general, in the fermentation processes two types of microorganism are used: (i) endogenous microorganisms isolated from natural sources and (ii) pure culture microorganisms obtained from collections. In both cases, the microorganisms can be used alone or as part of a mixed culture in the preparation of starter inoculum for the fermentation. Mixed cultures are used in traditional fermented foods, often determining their texture and flavor, and in the treatment of hazardous and nonhazardous wastes (11, 12). In these applications, however, the interactions among the components of the mixed culture are poorly understood. Several simple mathematical models have been proposed to predict the activity of mixed cultures; however, these predictions are inaccurate for mixtures of greater than two microorganisms (13). An alternative strategy to characterize mixed cultures relies on preparing and testing mixed cultures of variable composition. The obvious drawback of this strategy is the time and resources required to obtain data (14, 15). A statistically based experimental design can be used for optimization purposes, allowing a search over several variables with a reduced number of experiments. This strategy relies on several standard statistical tools globally known as response surface methodology (16, 17). Response surface methodology can be also used for mixture designs. In a mixture design, the factors are components or ingredients of a mixture, and consequently, their levels are not independent: if x_1, x_2, \dots, x_p denote the proportions of p components of a mixture,

* To whom correspondence should be addressed. Tel: (+52) 461 61 1 75 75. Fax: (+52) 461 61 1 79 79. E-mail: jlnb@itc.mx.

† Instituto Tecnológico de Celaya.

‡ Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (PROPAC).

then the levels are fractions and their sum should be equal to 1 $[(0 \leq x_i \leq 1) \text{ and } (x_1 + x_2 + \dots + x_p = 1)]$ (16). Mixture design based on statistical experimental design has been successfully used to evaluate the influence of sugars and acids in mango flavor (18), to study the effect of nutrients in soybean growth and its subsequent assimilation by herbivores (19), and to study the efficacy of pesticide applications (20).

The main objective of this study is to characterize the effect of endogenous microorganisms on marigold flower ensilage efficiency and the total xanthophyll extraction yield. We address the optimization of the culture used in the ensilage as an alternative to improve the efficiency of the overall extraction. The illustration presented here includes a study of the enzymatic activity of the microorganisms in a model cellulose solution. The results on these assays allow us to gain a partial understanding of the events taking place during the ensilage of marigold flowers and explain the mixed culture composition which gives optimal extraction yield. We also demonstrate the feasibility of an experimental mixture design combined with surface response methodology to quantify the relative importance of a microorganism within a mixed culture, leading to the optimization of the starter culture inoculum.

MATERIALS AND METHODS

Fresh Material. Fresh marigold flowers (*T. erecta*) were supplied by Industrias Alcosa, S. A. de C. V. Guanajuato, México. A single batch was used for all experiments. The flowers were separated from the receptacles and the petals were mixed until a homogeneous sample was obtained (visual inspection).

Microorganism. Microorganisms associated as normal flora of the marigold flower [*Flavobacterium* *Ilb* (C₁), *Acinetobacter anitratus* (C₂), *Enterobacter intermedius* (C₃), *E. aerogenes* (C₄), *E. agglomerans* (C₅), *Rhizopus nigricans* (H₁) and *Geotrichum candidum* (H₂)] were previously isolated and identified following the techniques described in refs 21 and 22. To evaluate the effect of the microorganisms, by themselves or within a mixed culture, on the ensilage of fresh marigold petals and their enzymatic activity via essays on a carboxymethyl cellulose (CMC – high viscosity; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution, microorganisms from the same pure culture were used for all treatments.

Culture Preparation. The microorganisms were cultured on nutrient and potato dextrose (PDA) agars (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) slants at 28 °C for 24 h. Biomass taken from the slants was transferred to 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of potato dextrose or nutrient (for fungi and bacteria respectively) broth (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), incubated on a rotary shaker at 28 °C and 175 rpm (Forma Scientific, model 4520) for 30 h. Samples were taken every 2 h for kinetic growth and enzymatic activity studies. The kinetics studies allowed us to determine the time (microorganism's growth phase) at which the largest amount of cellulase is expressed by a particular microorganism.

Microorganism Growth. For determining cellular dry weight (cdw), a known fermentation broth volume was filtered using Millipore membranes (0.45 μm pore size). The membranes and cell pellets were then dried at 90 °C for 12–16 h, until a constant weight was obtained.

Enzymatic Activity. In preliminary experiments, we found that the cellulase is expressed and excreted into the growth medium by each microorganism. These preliminary experiments consisted of electrophoresis over standard SDS–polyacrylamide gels with concentrations in the range 3–20% (23). Gels exposed to supernatant without microorganisms, supernatant with lysed microorganisms, and cellulase from *Aspergillus niger* (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were examined. Our results showed that the gels exhibited the same bands with similar intensity at the same locations, indicating that the cellulase is expressed and excreted by the microorganisms under study.

For enzymatic activity studies, the biomass obtained from the Erlenmeyer flask propagation was centrifuged at 6000 rpm (Hermle, model Z383). The supernatant obtained was used as raw cellulase

extract (ε). A 20 mL volume of raw extract was added to 100 mL of a mixture of carboxymethyl cellulose of 2 g/L that had a viscosity (η) of 4500 centipoises (cp) (Schoot Visco Easy-L). The solutions obtained were kept on a rotary shaker at 28 °C at 175 rpm (Forma Scientific, model 4520) for 24 h. The enzymatic activity was measured indirectly as a function of viscosity (η) reduction.

Mathematical Methods. We consider here a batch fermentation model in which growth is described by the logistic model (24):

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \left(1 - \frac{N}{N_m}\right) \quad (1)$$

and product formation is described by Leudeking–Piret kinetics (25):

$$\frac{dE}{dt} = \alpha \left(\frac{dN}{dt}\right) + \beta N \quad (2)$$

That considers the product formation (enzyme) as a cell mass function. By solving the above equations (with $N = N_0$ and $E = E_0$ at $t = 0$), the expression that models the enzyme production is

$$E - E_0 = \beta \left[N_m t + \frac{N_m}{\mu} \ln \left(\frac{N_0}{N_m} - \left(\frac{N_0}{N_m} - 1 \right) e^{-\mu t} \right) \right] + \alpha (N - N_0) \quad (3)$$

where

$$N = \frac{N_0}{\frac{N_0}{N_m} - \left(\frac{N_0}{N_m} - 1 \right) e^{-\mu t}} \quad (4)$$

The parameters α and β were calculated from experimental data, using nonlinear optimization via least squares and Levenberg–Marquardt methods, where E is the enzyme concentration, N is the biomass, N_m is the maximum biomass produced, μ is a rate-specific growth constant, and α and β are coefficients that determine whether metabolite production is associated ($\beta = 0$) or not ($\alpha = 0$) with growth. From the experimental data, the enzyme concentration (E) was evaluated as $(V_0 - V/V_0 - V_t)$, where V_0 is the initial viscosity, V is the viscosity at a given time, and V_t is the final viscosity.

Ensilage Studies. To evaluate the effect on marigold flower ensilage of a mixed culture or a single microorganism, we used sterile (15 min, 121 °C in a Brinkmann sterilizer model 2540E) fresh marigold flower petals. The petals were placed in Petri dishes, blended with 10 mL of starter inoculum (its composition dictated by the experimental design) and sealed to keep anaerobic conditions. Sterile flower petals were placed in Petri dishes without inoculum as controls. Static samples were incubated over 7 days at 28 °C. The ensiled products were dehydrated in a vacuum oven (Shel lab. model 1430) to 10% ($\pm 1\%$) moisture content. Dehydrated samples were milled (0.5-mm sieve) using a Brinkmann mill (Brinkmann, Wesbury, NY). The flour obtained was analyzed by AOAC method 970.64 to determine the total xanthophylls concentration (26).

Experimental Strategy. During the ensilage studies, two experimental designs were used. First, we applied a *screening* design. Every possible combination of microorganisms was studied using a statistical framework. The results were expressed via a least squares model and used to predict which microorganisms have significant activity in the ensilage process. Second, we devised a *centroid simplex* design, which includes additional runs to account for nonadjustable data, allowing us to estimate the prediction error of the statistical model and find the optimum mixture of microorganisms for the ensilage and enzymatic activity studies (16).

Statistical Model. Higher-order terms are frequently necessary in the mixture model because of the constraint $\sum x_i = 1$. Furthermore, complex phenomena that require descriptions encompassing large experimental regions often require elaborate models. However, the terms in these models have relatively simple interpretations. The linear terms describe the expected response for pure cultures ($x_i = 1$ and $x_j = 0, j \neq i$), as well as the linear blending portion. When there is curvature arising from nonlinear mixing between component pairs (quadratic terms), the terms represent either synergistic or antagonistic effects

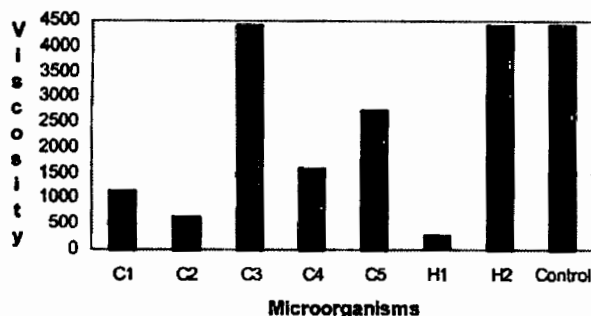


Figure 1. Reduction in viscosity from 4500 cp by raw cellulose enzyme extract (ϵ) in a CMC solution.

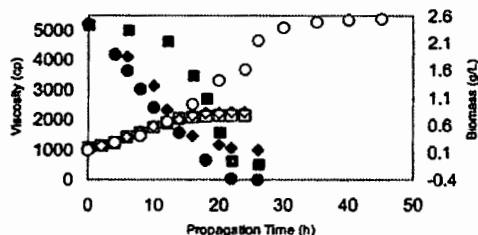


Figure 2. Kinetic growth and cellulase synthesis in batch culture. The open markers indicate the cell concentration in dry weight (right axis) for *Flavobacterium Iib* (\diamond), *A. anitratus* (\square), and *R. nigricans* (\circ). The filled markers indicate the viscosity change associate with expression of cellulase (left axis) by *Flavobacterium Iib* (\blacklozenge), *A. anitratus* (\blacksquare), and *R. nigricans* (\bullet).

dictated by their signs (16). The experimental results described below were performed in duplicate, and the reported values represent the mean values of these duplicated experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

A qualitative analysis of the change in viscosity observed in the CMC solutions after addition of raw enzyme extract (ϵ) showed that only the bacteria *Flavobacterium Iib* (C_1), and *A. anitratus* (C_2), and the fungus *R. nigricans* (H_1) exhibited significant cellulase enzymatic activity (Figure 1). An analysis of the dependence of the enzyme concentration on growth rate revealed that the maximum enzymatic activity occurred at 16, 23, and 26 h of propagation time for *Flavobacterium Iib* (C_1), *A. anitratus* (C_2), and *R. nigricans* (H_1), respectively (Figure 2). The enzymatic activity at these propagation times showed maximum viscosity reduction in the CMC solution of 77.27, 88.64, and 93.64% for raw extract cellulase enzyme (ϵ) from *Flavobacterium Iib* (C_1), *A. anitratus* (C_2), and *R. nigricans* (H_1), respectively.

The application of the logistic model to the data allows the fit of μ , which in turn is used to describe α and β via least squares and Levenberg–Marquardt methods. Model analysis of enzyme concentration dependence on growth rate during batch fermentations showed that the parameter β was near zero for *Flavobacterium Iib* (C_1) and *R. nigricans* (H_1), indicating that enzyme production for these microorganisms was associated with biomass growth. The parameter α was near zero for *A. anitratus* (C_2); thus, enzyme production by this microorganism was not associated with biomass growth (Table 1 and Figure 3).

Symbiotic or Antagonistic Effects. Mixed Culture Designs.

In the previous analysis, experiments were carried out using raw enzyme extract (ϵ) from single cultures. To explore the existence of symbiotic or antagonistic relationships among the different microorganisms in regard to their enzyme production,

Table 1. Characteristic Parameters of the Leudeking–Piret Equation Fitted from Experimental Data

	microorganisms		
	C_1	C_2	H_1
N_0 (g/L)	0.178	0.170	0.110
N_m (g/L)	0.82	0.80	2.50
μ (h^{-1})	0.257	0.287	0.157
(R^2)	0.99	0.99	0.99
α	0.801	0.0	0.594
β	0.036	0.998	0.993
(R^2)	0.99	0.99	0.99

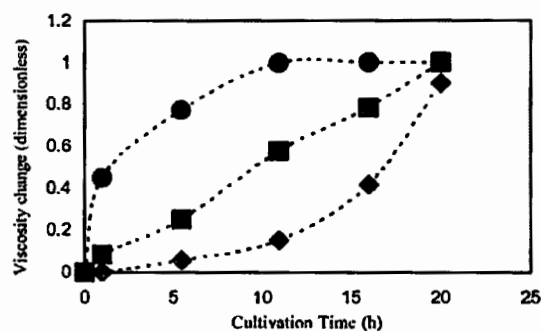


Figure 3. Viscosity change as a function of cultivation time. Nonlinear regression was used for each set of data to determine whether metabolite production is associated [$(\beta \rightarrow 0)$ for *Flavobacterium Iib* (\blacklozenge) and *R. nigricans* (\bullet)] or not [$(\alpha \rightarrow 0)$ for *A. anitratus* (\blacksquare)] with growth.

Table 2. Experimental Design for Mixed Cultures with the Microorganism with Larger Cellulase Activity

runs/mixture	ϵ_{C_1}	ϵ_{C_2}	ϵ_{H_1}	viscosity (cp)
1	1.0	0	0	340
2	0	1.0	0	190
3	0	0	1.0	10
4	0.5	0.5	0	490
5	0.5	0	0.5	40
6	0	0.5	0.5	50
7	0.333	0.333	0.333	75

we devised a *centroid simplex* design using the raw enzyme extract (ϵ) of the three microorganisms [*Flavobacterium Iib* (C_1), *A. anitratus* (C_2), and *R. nigricans* (H_1)] that exhibited the greatest enzymatic activity. Once again, we evaluated the activity in each experiment as the viscosity change of a CMC solution. Table 2 presents the final viscosity observed for each experiment within the design.

The analysis of data suggests a special cubic model (the fit was achieved using least squares):

$$[\eta] = 340\epsilon_{C_1} + 190\epsilon_{C_2} + 10\epsilon_{H_1} + 900\epsilon_{C_1C_2} - 540\epsilon_{C_2H_1} - 3315\epsilon_{C_1C_2H_1}$$

In this model, the coefficient for the raw extract of H_1 (ϵ_{H_1}) is significantly different than for the other terms, indicating that the enzyme extract from this microorganism was more effective in achieving cellulose degradation. The coefficient of the nonlinear term involving C_1C_2 is positive; thus, this mixed extract exhibited a synergistic effect. However, the results presented in Table 2 and Figure 4 indicate that a mixture of raw extracts from C_1 and C_2 did not reduce viscosity as much as the raw extracts from each microorganism alone. The remaining nonlinear coefficients are all negative, indicating

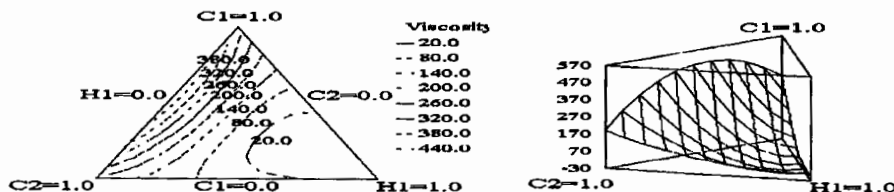


Figure 4. Contours of estimated response surface from the special cubic order model. The lower viscosity is achieved when the mixed extract is composed by $C_1 = 0.19$; $C_2 = 0.13$, and $H_1 = 0.67$.

antagonistic interactions. From the results presented in Table 2 and Figure 4, one can also conclude that the raw extract from H_1 resulted in the largest reduction in viscosity of the CMC solution.

The fitted model is graphically represented in Figure 4. The location of the optimum can be accurately computed via standard constrained optimization techniques based on the Newton–Raphson method (27). The constraints are as follows:

$$0 \leq \epsilon_{C_1} \leq 1.0$$

$$0 \leq \epsilon_{C_2} \leq 1.0$$

$$0 \leq \epsilon_{H_1} \leq 1.0$$

$$\epsilon_{C_1} + \epsilon_{C_2} + \epsilon_{H_1} = 1.0$$

The solution of the system gives the optimum raw extract composition: $\epsilon_{C_1} = 0.19$, $\epsilon_{C_2} = 0.13$, and $\epsilon_{H_1} = 0.68$. An extract with this composition will maximize cellulase activity, measured via the viscosity reduction of a CMC reference solution.

Ensilage Runs: Screening Mixture Design. The previous results appear to indicate that only three of the originally isolated microorganisms have significant cellulase activity. Ultimately, however, it is total xanthophyll recovery that is important. Thus, we performed an ensilage screening study using all seven microorganisms in a mixture design (Table 3). This study attempted to validate the enzymatic activity studies, using total xanthophyll extraction (X_t) from ensilage products as the response variable.

Once again, the data analysis suggests that a compact description of the results can be obtained via fitting a first-order model. However, the analysis of variance of the model

$$[X_t] = 19.86C_1 + 17.1277C_2 + 14.2044C_3 + 16.0312C_4 + 14.9451C_5 + 17.1917H_1 + 12.2842H_2$$

indicates (Table 4) that, for a probability distribution value (PV) of 0.1, the model is not a good representation of the data. Even though the model is not a good representation of the data, it can be used to explore the contributions of the different microorganisms in the extraction yield. Note that the coefficients of the model have the following magnitude order: C_1 , C_2 , H_1 , C_4 , C_5 , C_3 , and H_2 . Thus, the model suggests that bacteria C_1 , C_2 , and C_4 , as well as the fungus H_1 , are the main contributors in the xanthophyll yield extraction. It is important to note that the maximum values of the yield reported (Table 3) exhibit a significant increase when compared with the control run. The noted relative importance of C_1 , C_2 , C_4 , and H_1 is confirmed by looking at the individual response of the experiments: runs 8 (C_2 , C_4 , C_5 , H_1 ; 25% of each one), 16 (C_1 , C_2 , C_3 , H_1 ; 25% of each one), 17 (C_2 , C_3 and C_4 ; 33% of each one), 20 (C_1 , C_4 and C_5 ; 33% of each one), and 21 (C_1 , C_2 ; 50% of each one),

Table 3. Screening Mixture Design for All Microorganisms of Interest for Xanthophylls Extraction

run/ mixture	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	H_1	H_2	$[X_t]^a$
control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	12.97
1	1.0							19.13
2		1.0						14.29
3			1.0					13.03
4				1.0				15.31
5					1.0			15.69
6						1.0		14.93
7							1.0	13.67
8	0	0.25	0	0.25	0.25	0.25	0	21.33
9	0	0	0.25	0	0.25	0.25	0.25	15.43
10	0.25	0	0	0.25	0	0.25	0.25	15.06
11	0	0.334	0	0	0.333	0	0.333	13.03
12	0	0	0.5	0	0	0.5	0	17.46
13	0	0	0	0.5	0	0.5	0	16.50
14	0.5	0	0	0	0.5	0	0	15.91
15	0.333	0.333	0	0	0	0.334	0	14.39
16	0.25	0.25	0.25	0	0	0.25	0	23.35
17	0	0.333	0.333	0.334	0	0	0	22.75
18	0.25	0	0.25	0.25	0.25	0	0	16.69
19	0.14	0.14	0.15	0.14	0.14	0.14	0.15	14.09
20	0.333	0	0	0.334	0.333	0	0	21.47
21	0.5	0.5	0	0	0	0	0	23.24
22	0.166	0.166	0.167	0.166	0.166	0	0.166	13.26
23	0.166	0.166	0.166	0.166	0.167	0.166	0	17.90
24	0.333	0.333	0.334	0	0	0	0	15.75

^a $[X_t]^a$ = concentration of total xanthophyll in the flour (g of total xanthophylls/g of flour).

Table 4. Analysis of Variance for the Screening Design^a

source variation	SS	DF	SM	FR	PV
lineal model	53.76	6	8.96	1.04	0.43
error	146.47	17	8.59		

^a SS = squares sum, DF = degrees of freedom, SM = squares of the means, FR = Fisher relationship, PV = probability distribution value.

which contain large proportions of the four microorganisms, exhibit the largest total xanthophyll extraction values.

These preliminary observations give the basis to select a reduced set of microorganisms C_1 : *Flavobacterium I1b*, C_2 : *A. anitratus*, C_4 : *E. aerogenes*, and H_1 : *R. nigricans* as the most significant in the ensilage process of marigold flower.

Mixed Cultures Optimization in Marigold Ensilage. We performed a second mixture design for the four microorganisms seeking to establish the composition of the culture to be used in the ensilage process. We used a *centroid simplex* design involving pure cultures, as well as all possible combinations of the four microorganisms. Once again, the response variable is total xanthophyll concentration in the product. Table 5 presents the design and the achieved xanthophyll concentration for each experiment. To facilitate the optimum location, the data are fit

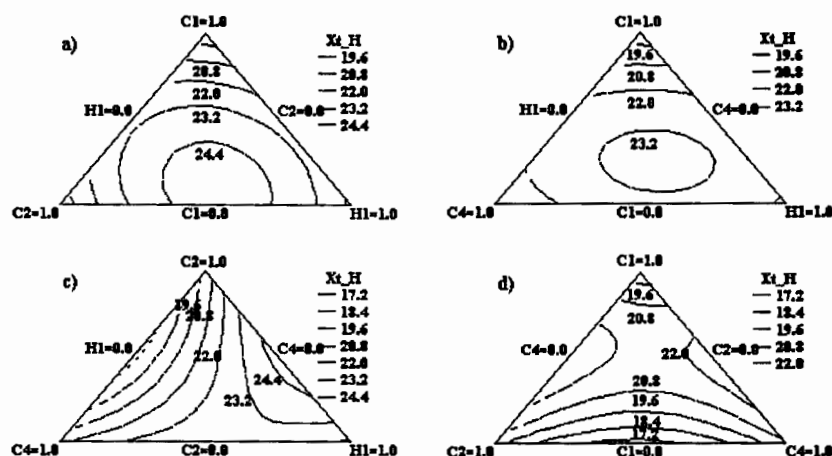


Figure 5. Contours of estimated response surface from the second-order model. Panels c and d indicate an antagonistic effect between C_2 : *A. anitratus* and C_4 : *E. aerogenes*. The maximum xanthophylls extraction yield is achieved when the concentration of the bacteria C_4 tends to zero and the estimated optimum inoculum starter is composed by $C_1 = 0.12$; $C_2 = 0.40$; $C_4 = 0.0$; and $H_1 = 0.48$.

Table 5. Mixture Design for the *Centroid Simplex Design*^a

run/mixture	C_1	C_2	C_4	H_1	$[X]_F$
control	0.0	0.0	0.0	0.0	12.95
1	1.0	0	0	0	18.88
2	0	1.0	0	0	20.12
3	0	0	1.0	0	20.59
4	0	0	0	1.0	21.62
5	0.5	0.5	0	0	21.86
6	0.5	0	0.5	0	21.93
7	0.5	0	0	0.5	22.67
8	0	0.5	0.5	0	16.66
9	0	0.5	0	0.5	25.17
10	0	0	0.5	0.5	23.78
11	0.333	0.334	0.333	0	22.61
12	0.333	0.333	0	0.334	24.94
13	0.334	0	0.333	0.333	22.60
14	0	0.333	0.334	0.333	20.30
15	0.25	0.25	0.25	0.25	23.42

^a $[X]_F$ = concentration of total xanthophyll in the flour (g of total xanthophyll/kg flower flour).

Table 6. Analysis of Variance for the *Centroid Simplex Design*^a

source variation	SS	DF	SM	FR	PV
quadratic model	63.39	9	7.04	4.45	0.05
total error	7.92	5			

^a SS = squares sum, DF = degrees of freedom, SM = squares of the means, FR = Fisher relationship, PV = probability distribution value.

to a second-order polynomial model:

$$[X]_F = 18.693 C_1 + 20.005 C_2 + 20.612 C_4 + 21.769 H_1 + 14.074 C_1 C_2 + 10.999 C_1 C_4 + 9.542 C_1 H_1 - 13.886 C_2 C_4 + 15.741 C_2 H_1 + 6.796 C_4 H_1$$

The analysis of variance (Table 6) shows that this model is a good representation of the data for a probability distribution value (PV) smaller than 0.05. In this model, we observe that the coefficients of the linear terms are very similar, indicating that all four microorganisms by themselves will achieve similar yields. On the other hand, since all nonlinear terms are positive, except the $C_2 C_4$ coefficient, the mixed cultures will exhibit favorable synergic effects. The $C_2 C_4$ interaction can be characterized as antagonistic.

The contours of the fitted model are represented graphically in Figure 5a–d. This representation makes the existence of an antagonistic effect more evident between the bacteria C_2 : *A. anitratus* and C_4 : *E. aerogenes*. In addition, the maximum yield of xanthophyll is achieved when the concentration of the bacteria C_4 : *E. aerogenes* approaches zero (Figure 5c,d). This result, along with the enzymatic activity study presented previously, leads to the exclusion of the C_4 bacteria from the optimum mixed culture for xanthophyll extraction. The optimum mixed culture should, then, contain C_1 : *Flavobacterium I1b*, C_2 : *A. anitratus*, and H_1 : *R. nigricans* (Figure 5a).

Once again, the optimum is estimated via standard constrained optimization techniques, with the following constraints:

$$0 \leq C_1 \leq 1.0$$

$$0 \leq C_2 \leq 1.0$$

$$0 \leq C_4 \leq 1.0$$

$$0 \leq H_1 \leq 1.0$$

$$C_1 + C_2 + C_4 + H_1 = 1.0$$

The solution of this system gives an estimated optimum inoculum concentration of (C_1 : *Flavobacterium I1b* = 0.098; C_2 : *A. anitratus* = 0.41; C_4 : *E. aerogenes* = 0.0; and H_1 : *R. nigricans* = 0.492) and a maximum yield for the xanthophyll extraction of approximately 24.94 g/kg of dry weight (90% more than the control run). This result is similar to that obtained for the cellulase activity studies. In addition, these observations are consistent with the results reported previously (10), which demonstrated that the extraction yield was improved when dehydrated marigold flower was treated with a cellulase preparation.

CONCLUSIONS

In this contribution, we examined the efficiency of the ensilage process for xanthophylls extraction from marigold flower. We isolated several microorganisms from natural flora present in the traditional ensilage process. We studied their enzymatic activity and in particular the production of cellulase. From these studies, we conclude that the bacteria *Flavobacterium I1b* and *A. anitratus* and the fungus *R. nigricans* exhibit

significant synthesis and excretion of this enzyme as measured via the reduction in viscosity of a CMC solution. Parallel kinetic studies allowed us to detect the optimum propagation times for each microorganism, which were 16, 23, and 26 h, respectively. These times were selected as the inoculum age to be used in the ensilage studies. The analysis of the enzymatic activity experiments suggest a mixed culture composition given by the following values: C₁: *Flavobacterium I1b* = 15%; C₂: *A. anitratus* = 12%; and H₁: *R. nigricans* = 73% as the starter inoculum.

The ensilage studies, based on mixture experimental designs and response surface methodology, revealed that the inoculum consisting of C₁: *Flavobacterium I1b* = 9.8%; C₂: *A. anitratus* = 41%; and H₂: *R. nigricans* = 49.2% leads to a significant increase in the yield of the total xanthophylls extracted (90% more than the control).

The results of both studies, enzymatic activity and ensilage, suggest that the level of cellulase is the main factor responsible for structural polymer degradation of the cellular walls in the marigold flower petals, facilitating mass transfer and increasing the total xanthophyll extraction.

The differences between the optimum starter inoculum values obtained via the enzymatic activity and ensilage experiments cannot be fully explained by our experimental methodology. These differences may be the result of diffusional phenomena or also could be due to differences in the chemical nature of marigold cell walls (mix of cellulosic and hemicellulosic polymers) as compared to the CMC model. Perhaps other enzymatic activity from the starter cultures contributes to xanthophylls yield in concert with cellulase action.

Our work indicates that the statistical experimental mixture design and the response surface methodology are useful tools for the evaluation of the enzymatic performance of microbial communities.

LITERATURE CITED

- Hencken, H. Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poult. Sci.* **1992**, *71*, 711–717.
- Tyczkowski, J. K.; Hamilton, P. B. Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicosis in young chickens. *Poult. Sci.* **1987**, *66*, 1184–1188.
- Seddon, J. M.; Ajani, U. A.; Sperduto, R. D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T. C.; Farber, M. D.; Gragoudas, E. S.; Haller, J.; Miller, D. T.; Yannuzzi, L. A.; Willett, W. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. A multicenter study. *J. Am. Med. Assoc.* **1994**, *272*, 1413–1420.
- Fullmer, L. A.; Shao, A. The role of lutein in eye health and nutrition. *Am. Assoc. Cereal Chem.* **2001**, *46* (9), 408–413.
- Kreienbuhl, P.; Rudin, P.; Rudolph, W. Method of making carotenoids. U.S. Patent No. 6,150,561, 2000.
- Vázquez, M.; Martin, A. M. Optimization of *Phaffia rhodozyma* continuous culture through response surface methodology. *Bio-technol. Bioeng.* **1998**, *57* (3), 315–320.
- Hirschberg, J.; Harker, M. Carotenoid-producing bacterial species and process for production of carotenoids using same. U.S. Patent No. 5,935,808, 1999.
- Jacobson, G. K.; Jolly, S. O.; Sedmak, J. J.; Skatrud, T. J.; Wasileski, J. M. Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma* method for their cultivation and their use in animal feeds. U.S. Patent No. 6,015,684, 2000.
- Favati, F.; King, J. W.; Friedrick, J. P. Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. *J. Food Sci.* **1988**, *53* (5), 1532–1536.
- Delgado-Vargas, F.; Paredes-López, O. Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (4), 1097–1102.
- Lechner, U. Reductive dechlorination of 1,2,3,4-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin and its products by anaerobic mixed cultures from Saale River sediment. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31* (6), 1749–1753.
- Chen, I. M.; Chang, F. C.; Chang, B. V.; Wang, Y. S. Specificity of microbial activities in the reductive dechlorination of chlorinated benzenes. *Water Environ. Res.* **2000**, *32* (6), 675–680.
- Bouksain, M.; Lacroix, C.; Audet, P.; Simard, R. E. Effects of mixed starter composition on nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL 719 during production and ripening of Gouda cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2000**, *59* (3), 141–156.
- Sodini, I.; Latrielle, E.; Corrieu, G. Identification of interacting mixed cultures of lactic acid bacteria by their exclusion from a model predicting the acidifying activity of noninteracting mixed cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54* (5), 715–718.
- Lee, S. S.; Ha, J. K.; Cheng, K. J. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to *in vitro* degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66* (9), 3807–3813.
- Montgomery, D. C. Response surface methods and other approaches to process optimization. In *Design and analysis of experiments*, 4th ed; John Wiley & Sons: New York, 1997; pp 372–422.
- Kennedy, M.; Krouse, D. Strategies for improving fermentation medium performance: A review. *J. Ind. Microbiol. Technol.* **1999**, *23*, 456–475.
- Malundo, T. M.; Shewfelt, R. L.; Ware, G. O.; Baldwin, E. A. Sugars and acids influence flavor properties of mango (*Mangifera indica*). *J. Am. Soc. Hortic.* **2001**, *126* (1), 115–121.
- Busch, J. W.; Phelan, P. L. Mixture models of soybean growth and herbivore performance in response to nitrogen-sulphur-phosphorous. *Ecol. Entomol.* **1999**, *24* (2), 132–145.
- Ebert, T. A.; Taylor, R. A. J.; Downer, R. A.; Hall, F. R. Deposit structure and efficacy of pesticide application. 1: Interaction between deposit size, toxicant concentration and deposit number. *Pest. Sci.* **1999**, *55* (8), 783–792.
- Stanier, R.; Ingraham, J.; Wheelis, M.; Painter, P. The methods of microbiology. In *The Microbial World*, 5th ed.; Prentice-Hall: Englewood Cliffs, New Jersey, 1986; p 17.
- Prescott, L. M.; Harley, J. P.; Klein, D. A. Clinical Microbiology. In *Microbiology*, 4th ed.; WCB/McGraw-Hill Inc.: Boston, MA, 1999; p 725.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
- Verhulst, P. F. Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement, *Corr. Math. et Phys.* **1838**, 113–121.
- Luedeking, R.; Piret, E. L. A kinetic study on the lactic acid fermentation. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* **1959**, *1*, 393–412.
- AOAC. Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists, 13th ed.; Washington, DC., 1992.
- Press, W.; Teukolsky, S.; Vetterling, W.; Flannery, B. Root Finding and Nonlinear Sets of Equations. In *Numerical Recipes in Fortran 77. The Art of Scientific Computing Volume I. Second Edition*. University of Cambridge Press: New York, 1996; pp 340–386.

Received for review June 26, 2002. Revised manuscript received January 16, 2003. Accepted February 6, 2003.

JF0257650

Navarrete-Bolaños José Luis · Jiménez-Islas Hugo ·
Botello-Alvarez Enrique · Rico-Martínez Ramiro ·
Paredes-López Octavio

An optimization study of solid-state fermentation: xanthophylls extraction from marigold flowers

Received: 15 November 2003 / Revised: 3 March 2004 / Accepted: 21 March 2004

© Springer-Verlag

Abstract Marigold flowers are the main natural source of xanthophylls, and marigold saponified extract is used as an additive in several food and pharmaceutical industries. In this work, the use of a solid-state fermentation (ensilage) process for increasing the yield of xanthophylls extracted from fermented marigold flowers was examined. The process consisted of a mixed culture of three microorganisms (*Flavobacterium I1b*, *Acinetobacter anitratus*, and *Rhizopus nigricans*), part of the normal microbiota associated with the marigold flower. These microorganisms had been previously isolated, and were identified as relevant for the ensilage process due to their capacity to produce cellulolytic enzymes. Based on experimental design strategies, optimum operation values were determined for aeration, moisture, agitation, and marigold-to-inoculum ratio in the proposed solid-state fermentation equipment, leading to a xanthophylls yield of 17.8-g/kg dry weight. The optimum achieved represents a 65% increase with respect to the control. HPLC analysis indicated conservation of extracted oleoresin. Based on the experimental results, interactions were identified that could be associated with the heat and mass-transfer reactions taking place within the bioreactor. The insight gained allows conditions that limit growth and metabolic activity to be avoided.

Keywords Marigold · Fermentation · Ensilage · Xanthophylls · Extraction

N.-B. J. Luis (✉) · J.-I. Hugo · B.-A. Enrique · R.-M. Ramiro
Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, Instituto
Tecnológico de Celaya,
Ave. Tecnológico s/n,
C.P. 38010 Celaya, Gto, Mexico
e-mail: jlnb@itc.mx
Tel.: +52-461-6117575
Fax: +52-461-6117979

N.-B. J. Luis · R.-M. Ramiro · P.-L. Octavio
Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos
(PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro,
Cerro de las Campanas s/n,
C.P. 76010 Querétaro, Qro, Mexico

Introduction

The most efficient way to produce many chemicals is to extract them directly from natural sources. The marigold flower (*Tagetes erecta*) is one of the richest natural sources of xanthophylls, mainly lutein (Ausich and Sanders 1997). Marigold extracts have been commercialized internationally and are used as additives for poultry feed (Levi 2001), as they provide bright colors in egg yolks, skin, and fatty tissues. The poultry pigmentation is often associated with good health and premium quality (Bletner et al. 1966; Hencken 1992; Levi 2001; Tyczkowski and Hamilton 1987; Winstead et al. 1985). Recent research efforts have focused on the use of marigold extracts as human nutritional supplements. The potential benefits reported include cancer prevention and enhanced immune function (Chew et al. 1996), inhibition of the auto-oxidation of cellular lipids (Zhang et al. 1991), protection against oxidant-induced cell damage (Martin et al. 1996), and prevention of age-related macular degeneration (Fullmer and Shao 2001; Seddon et al. 1994). These attributes have sparked interest in the development of new methods for xanthophylls production, such as chemical synthesis (Kreienbuhl et al. 2000) and fermentation technology (Gierhart 1994; Hirschberg and Harker 1999; Jacobson et al. 2000). However, despite the success of these innovative efforts, there are practical limitations involving the removal of toxic solvents used in chemical synthesis (Kreienbuhl et al. 2000), and the low yields obtained in fermentation processes (Jacobson et al. 2000). An alternative is to seek improved xanthophylls production through extraction and purification of plant material (marigold flower) thereby rendering concentrates with an enhanced content of xanthophylls in their natural ester form (Levi 2001). Several different methods have been proposed in order to improve both xanthophylls extraction and purification efficiency (Ausich and Sanders 1997; Khachik 1995; Philip 1997). The disadvantage of these processes is that they require high temperatures, up to 70°C, and long processing times, which can result in the

degradation and formation of unwanted isomeric components (Levi 2001; Madhavi and Kagan 2002).

In related efforts, enzymatic treatment has been proposed as an alternative stage to enhance xanthophylls extraction from marigold flower (Bárzana et al. 2002; Delgado-Vargas and Paredes-López 1997). Petals treated with 0.1% (w/w) Econase-cep (Enzyme Development Corporation, New York, N.Y., USA) for a period of 120 h produced a significant increment in xanthophylls yields (24.7-g/kg dry weight) that compared favorably with the yield from the untreated control (11.4-g/kg dry weight) (Delgado-Vargas and Paredes-López 1997). Recently, a novel alternative involving simultaneous enzymatic treatment and solvent extraction was developed (Bárzana et al. 2002). In that study, enhanced yields (>85%) of recovered carotenoids were obtained from fresh flowers macerated with 0.3% (v/w flower) Viscozyme/Neutrase (Novo-Nordisk, Denmark) and simultaneously treated with hexane (Bárzana et al. 2002). However, the enzymatic treatments also posed present practical limitations, mainly the use of expensive commercial enzyme.

For almost 20 years, supercritical fluid extraction (SFE) has been a viable alternative for many commercial separation applications, because it exhibits more favorable mass-transfer rates, lacks residual toxicity, and has a low environmental impact. SFE technology has been used to obtain carotene, lutein, and oleoresin from marigold (Favati et al. 1988; Naranjo-Modad et al. 2000). These studies demonstrated the feasibility of obtaining enriched extracts via selective extraction of natural pigments. However, such SFE processes are, at present, commercially impractical primarily due to high capital costs (Kanel and Marentis 2000). Xanthophyll extraction processes, more extensively used at the industrial level, are those based on the use of hexane (Industrias Alcosa S.A. de C.V., Celaya, Gto, Mexico). Briefly, the commercial extraction of xanthophylls (oleoresin) from marigold flower involves the following stages: ensilage, pressing, drying, hexane extraction, and saponification. Of these, the ensilage is considered critical in determining the efficiency of the overall process. In previous work (Navarrete-Bolaños et al. 2003), we studied the relationship between the xanthophylls extraction yield and the efficiency of marigold flower ensilage. We concluded that, during the ensilage, structural cell-wall degradation of the marigold petals by saprophytic microorganisms associated with the flower resulted in increased mass transfer during the extraction stage. Such an increase is associated with the level of cellulase synthesized by these microorganisms. In the same study, it was also shown that a mixed culture, comprising 9.8% *Flavobacterium IIb*, 41% *Acinetobacter anitratus*, and 49.2% *Rhizopus nigricans*, used during ensilage resulted in significant yield improvements: 24.9 g/kg (dry weight) compared with 12.9 g/kg for the uninoculated control. Nonetheless, the efficiency of the ensilage process remains largely unaddressed. In the present contribution, the ensilage (solid-state fermentation) process of marigold flower was

characterized and subsequently optimized, with the goal of increasing the xanthophylls extraction yield.

Materials and methods

Marigold flowers

Fresh marigold flowers (*Tagetes erecta*) from a single batch provided by Industrias Alcosa S.A. de C.V., Guanajuato, Mexico) were used for all experiments. The batch contained flowers with a yellow–orange coloration ratio of 10:90 and 30% average weight of receptacles. The fresh marigold flowers were stored at 4°C in sealed black polyethylene bags.

Marigold flower flour

Both fresh flowers and fermented samples were dried in a vacuum oven (Shel lab. Model 1430) to 10% ($\pm 1\%$) moisture content. Dried samples were milled to a particle size of 0.372 mm (flour). The flour obtained was analyzed by AOAC method 970.64 (AOAC 1984) to determine the total xanthophylls concentration.

Marigold flower oleoresin

Dried samples were leached using analytical grade hexane (J.T. Baker) under mild conditions (35°C during 15 min). Subsequently, the liquid phase was separated by centrifugation at 11,000 g (Hermle Z383 K) and concentrated in a Büchi rotary evaporator (model RE-

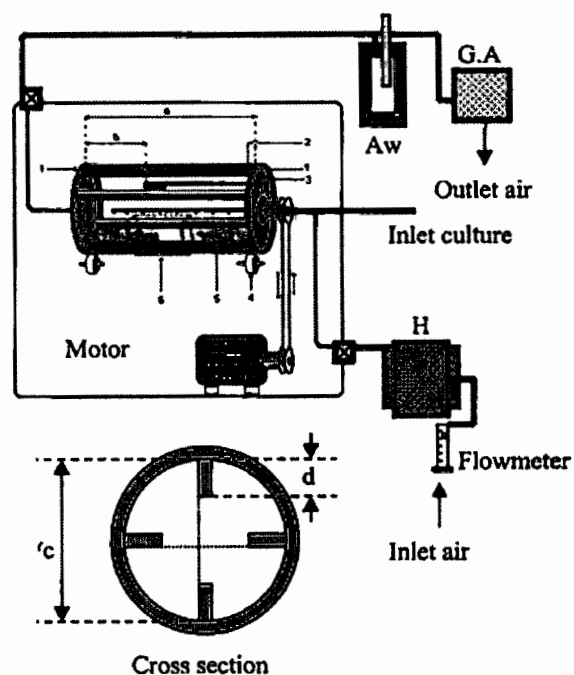


Fig. 1 The solid-state fermentation apparatus. 1 Steel cover, 2 steel drum, 3 inlet sensors, 4 supports, 5 baffles, 6 sampling ports. The drum cross-sectional diameter (c) to drum length (a) ratio is 1/2. Other dimensions are as follows: sensor placement, $b=c/3$, Baffle height, $d=c/12$. Also indicated in the schematic are the placements of the outlet gas analyzer (G.A.), moisture controller (H) and water activity sensor (Aw)

111) operating at 35°C and 50 rpm. The resulting concentrate (oleoresin) was analyzed by AOAC method 970.64 (AOAC 1984) to determine the total xanthophylls concentration and by high-performance liquid chromatography (HPLC) to determine the profiles of the main components.

High-performance liquid chromatography

For HPLC assays, a Varian chromatograph (model 9050), equipped with a quaternary pump solvent delivery and degassing system, was used. Samples consisting of 20 µl of saponified pigment at around 13% (w) were injected. Carotenoids were analyzed using a silica OH column (SGE BPX5 from SGE international). The solvent, containing 66.5% hexane, 1.5% isopropanol, and 32% acetone, was eluted at 1.0 ml/min at room temperature. The pigments were monitored at 447 nm, and 1-s and 2-nm time and wavelength resolutions, respectively. Chromatogram peaks were identified by comparison to the retention time of standards. The components profile was obtained using the relative percentage of HPLC chromatogram area.

Solid-state fermentation system

A modular rotating drum fermentation system (Biotechnica S.A. de C.V., Celaya, Mexico), equipped with inlet air injection, purification filters, variable speed pumps, humidifier, and gas analyzer, was used for solid-state fermentation (Fig. 1). The closed reactor has heat removal elements, ports for fluid and nutritive media addition, and controls for several environment-related parameters, including temperature. The rotating mechanism allows mixing of the reactor contents at any time and for any duration during the fermentation process. Thus, the apparatus provides great operational flexibility as well as the monitoring and control of critical variables of the process.

Culture of microorganisms

A mixed culture of microorganisms comprising the normal microbiota of the marigold flower (*Flavobacterium I1b*, *Acinetobacter anitratus*, and *Rhizopus nigricans*) was used as starter inoculum. To obtain starter inoculum, each microorganism was propagated and mixed in the proportions according to the method of Navarrete-Bolaños et al. (2003).

Experimental strategy

In order to efficiently evaluate the critical operating parameters and their interactions, the experimental strategy used sequential factorial designs. Factors considered included: X_1 , system moisture content; X_2 , agitation time interval; X_3 , inlet aeration; and X_4 , marigold

flower to inoculum ratio. The first, third, and fourth factors are related to microbial growth and product transformation, the second and third are important in determining the effective heat and mass-transfer requirements. The third factor was evaluated because the ensilage process consists of two phases: (1) aerobic fermentation and (2) anaerobic fermentation. During the first phase, the microorganisms use up the intraparticle oxygen. Under ideal conditions, with perfect packing and seals, the aerobic fermentation only lasts a few hours. During the second phase, anaerobic microbial growth is characterized by lactic acid production, reflected by a decrease in the pH.

Having defined the critical variables, the factors and component levels in the solid-state fermentation that lead to an enhanced yield of xanthophylls following extraction with hexane were determined. The first experimental strategy consisted of a factorial fractional design (divided in half) for two levels of each factor (X_1 , 70–85%; X_2 , 12–24 h; X_3 , 2–6 l/min; and X_4 , 900–1,200 g of marigold flowers fresh). In all runs, the starter inoculum concentrations (7.5 g/l) and the temperature (28°C) were kept constant, while the pH was uncontrolled (although it was monitored throughout the runs in order to detect any changes). Each experimental run lasted 7 days. This initial design served to identify the effect of the investigated factors on the response (xanthophylls yield). Under the fractional design, experimental tests, corresponding to the mean levels of the factors, were included in order to account for non-adjustable data and to estimate the prediction error of the statistical model. In this case, one additional experiment at these mean levels was added. The nine experiments with their coded levels (–1 for the lower level, +1 for the upper level and, 0 for the mean value), as well as their corresponding responses, are shown in Table 1.

Optimization strategy

The insight gained from the initial factorial fractional design was used as the basis to predict the factor levels generating the largest response value. With such prediction, a second 2^{4-1} factorial experiment was designed in order to reach a more accurate statistical description of the response-variable dependence on each factor level. Finally, in order to attain an even more accurate description of the response near the optimum operating values, a complementary strategy was used that took the form of a second-order composite design, with characteristics of rotatability and/or orthogonality. This experimentally based strategy relies on several standard statistical tools, globally known as response surface methodology (Montgomery 1997).

Statistical analysis

ANOVA procedures with probability distribution values were used (Statgraphics plus V 2.1 software). We also analyzed the effects on total xanthophylls extraction of the principal factors in the solid-state fermentation of marigold flowers. At every stage of this study, data analysis using least squares allowed the construction of models that

Table 1 Xanthophyll yields achieved for the experiments generated by the initial experimental design. The operating conditions are encoded to emphasize differences

Run number	X_1 (moisture)	X_2 (agitation)	X_3 (aeration)	X_4 (marigold)	Xanthophyll yield ^a
1	–1	+1	–1	+1	16.0
2	–1	–1	+1	+1	13.9
3	+1	–1	+1	–1	10.7
4	+1	+1	+1	+1	12.8
5	+1	–1	–1	+1	15.1
6	+1	+1	–1	–1	5.6
7	–1	–1	–1	–1	13.9
8	–1	+1	+1	–1	11.7
9	0	0	0	0	12.5

^aXanthophylls (g)/marigold flower flour (kg)

described the relationship between the factors and the response (xanthophylls yield).

Results

The optimization strategy described above was applied with the goal of identifying the operating conditions of the solid-state fermentation apparatus that lead to maximum xanthophylls yield. These operating conditions were coded as follows: X_1 , moisture; X_2 , agitation interval; X_3 , aeration rate; and X_4 amount of marigold flower used. The amount of inoculum was constant, other variables (pH) were left uncontrolled.

The total extraction of xanthophylls (response variable) resulting from the 2^{4-1} design is shown in the last column of Table 1. Analysis of variance (Table 2) showed that, for a confidence interval of 0.05, the factors X_1 , X_2 , X_3 , and X_4 were all significant, as were all interactions among them ($X_1X_2=X_3X_4$; $X_1X_3=X_2X_4$; $X_2X_3=X_1X_4$). Using Yates' algorithm, all variables could be confirmed as significant, and the effect of interactions on the yield of the extraction within the range explored in this initial set of experiments could be clarified. Firstly, in order to assess the appropriateness of the boundaries imposed on the factor levels, the combination of boundaries that would give the best xanthophylls yield was examined. This analysis indicated that by selecting X_1 , 70% moisture; X_2 , agitation every 12 h; X_3 , 2 l/min of aeration; and X_4 , 1,200 g fresh marigold flowers, the highest yield should be achieved. TA confirmation runs resulted in a xanthophylls yield of 15.1 g/kg fermented marigold flower flour under these conditions. Secondly, the analysis confirmed that the interactions X_1X_2 , X_1X_3 and X_2X_3 are significant. The X_1X_2

interaction is a mechanism to maintain moisture homogeneity in the bed substrate, and to avoid gradients that limit locally the microorganisms' growth. The X_1X_3 interaction indicated that, although aeration primarily served as a means to supply oxygen for cell growth and to flush out the produced carbon dioxide, it also enhanced moisture transfer between the solid and gas phases. However, aeration has also two "negative" effects, namely heat removal and desiccation of the substrate. The X_2X_3 interaction prevents temperature gradients within the substrate bed. Unfortunately, mixing during fermentation leads to damage of the cells and gross aggregation of substrate particles. The latter results in inhomogeneities in the local substrate temperature, thereby causing local differences in biomass growth and activity. In summary, both significant interactions, implicitly related to heat and mass-transfer requirements, may, in turn, translate into growth constraints. Combining the insight obtained from Yates' algorithm with the experimental results, it is possible to describe the relationship that exists among the significant main factors X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , and interactions X_1X_2 , X_1X_3 , and X_2X_3 by constructing a regression-based polynomial model using least squares. For this case, the regression model obtained is the following:

$$[X_i] = 12.469 - 1.41X_1 - 0.959X_2 - 0.185X_3 + 1.987X_4 - 0.914X_1X_2 + 0.899X_1X_3 + 0.919X_2X_3$$

Here, the variables are specified in their coded units. In this equation, one implicitly assumes that the dependence of the response variable with respect to the factors is linear and that the effects of these factors are additive. Analysis

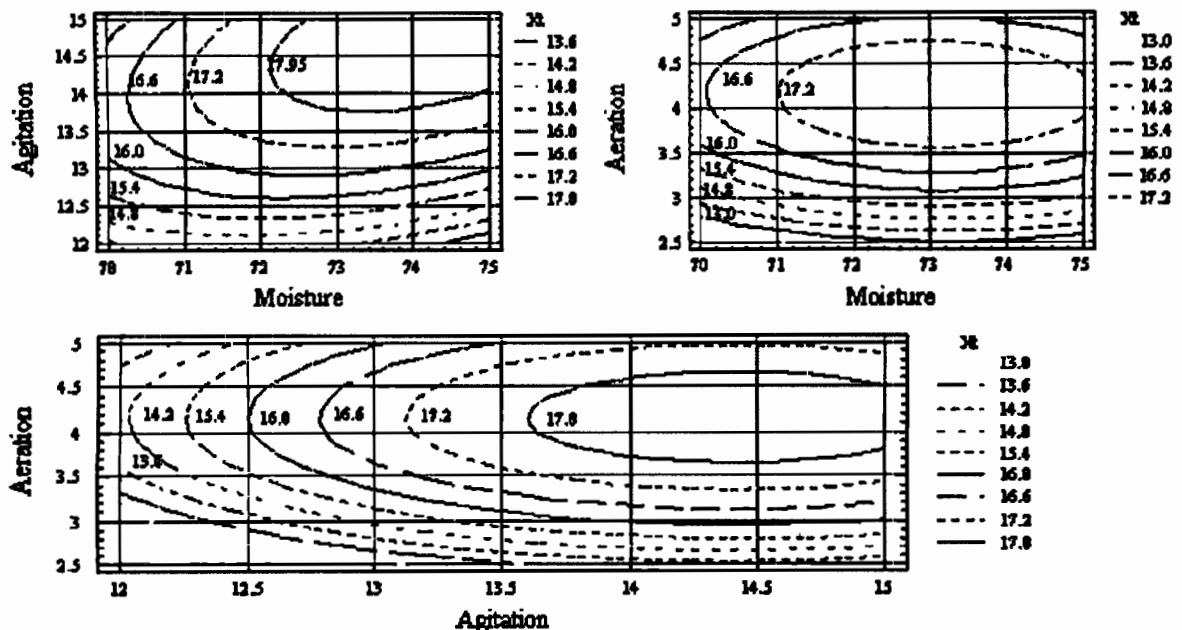


Fig. 2 Estimated response contours from the second-order model. The maximum xanthophylls yield is achieved when the moisture is 73.5%, intermittent agitation is used every 14.78 h, and 4.14 l air/min are injected to the solid-state fermentation system

Table 2 Variance analysis for the first 2^{4-1} design. $R^2=99.9$; standard error=0.0024. *SS* Sum of squares, *DF* degrees of freedom, *PV* probability distribution values

Source variation	SS	DF	PV
Main effects			
Factor X_1 : moisture	15.930	1	0.0004
Factor X_2 : agitation	7.3576	1	0.006
Factor X_3 : aeration	0.2726	1	0.00029
Factor X_4 : marigold	31.599	1	0.0003
$X_1X_2=X_3X_4$	6.6914	1	0.0006
$X_1X_3=X_2X_4$	6.4658	1	0.0006
$X_1X_4=X_2X_3$	6.7563	1	0.0006
Total error	5.8×10^{-6}	1	
Total	75.073	8	

of the model supports the adequacy of these assumptions under a statistical basis. The model can be tentatively accepted as a rough geometrical representation of the underlying response function over the experimental region explored thus far. Using this model, a search for the region for which the xanthophyll extraction will be maximized leads to the path of steepest ascent. A convenient set of points of the steepest ascent path is shown in Table 3. The proposed ascent path suggests conditions (run number 11 in Table 3) producing the best yield. Additional points beyond run number 11 will not be advantageous because the extraction yield decreases. Thus, a subsequent experimental design should be made in the neighborhood of this run. Taking the conditions of the run number 11 as the center of a new experimental region, a new factorial fractional design is built at two levels of each factor (X_1 , 65–75%; X_2 , 12–18 h; X_3 , 1–4 l/min; and X_4 , 1,100–1,400 g marigold flowers; Table 4). Statistical analysis of variance (Table 5) for this second 2^{4-1} experimental strategy shows that the main factor X_4 (volume) and the interaction $X_1X_2=X_3X_4$ are not significant (for a confidence interval of 0.05). Once again, using Yates' algorithm it can be shown that the factors X_1 , X_2 and X_3 , and the interactions X_1X_4 and X_2X_4 are significant in increasing yield extraction within this newly explored range of conditions. The X_1X_4 interaction is significant as a result of the relationship between the substrate moisture content, microorganismal growth, and substrate utilization by the microorganisms. The X_2X_4 interaction is significant

because mixing during fermentation favors gross aggregation of substrate particles, which in turn results in local differences in biomass growth and activity. As part of our analysis, the combination of boundaries that increase xanthophylls yield was again determined. In this case, X_1 , 75% moisture; X_2 , agitation every 12 h; X_3 , 4 l/min of aeration; and X_4 , 1,400 g fresh marigold flowers. Note that there is a progression of this combination of boundaries with respect to the one found with the first exploratory experimental design. Once again, the analysis is summarized via the construction of a regression-based polynomial model using least squares. For this case, the regression model obtained is the following:

$$[X_t] = 13.0655 + 0.645X_1 - 0.611X_2 - 1.846X_3 + 2.008X_1X_4 + 0.416X_2X_4$$

This "refined" model allows a better extrapolation, along the path of steepest ascent to the region where the xanthophylls extraction is maximized. Table 6 presents the predicted extrapolation path. Note that the predicted yields along this path exhibit only small differences. It is possible that the region near the optimum is very flat. In addition, the proposed ascent path suggests conditions (run 25 in Table 6) producing the best yield. Additional points beyond run 25 will not be used because the xanthophylls yield extraction diminishes. In addition, since Yates' algorithm suggests that variable X_4 (marigold flour amount) is not significant, this variable was kept constant at its mean level (1,250 g) for the remaining assays.

In order to obtain a better prediction of the set of variables maximizing yield, a third experimental strategy was devised. These involved only three operating variables (factors) with the following boundaries: X_1 , moisture (70–75%); X_2 , agitation (12–15 h); and X_3 , aeration (2.5–5 l/min). Since these conditions are assumed to span the region containing the optimum, a second-order composite design was chosen (Table 7). Similar experimental designs were originally proposed by Box and Behnken in 1960 (Montgomery 1997). The results of our strategy allow the system to be described via a second-order model in order to achieve better accuracy.

Table 3 Points on the first path of steepest ascent

Run number	Coded conditions				X_1 moisture (%)	X_2 agitation (h)	X_3 aeration (lpm)	X_4 marigold (g)	Xanthophyll yield ^a
	X_1	X_2	X_3	X_4					
9	0	0	0	0	77.5	18.0	4.0	1,050.0	12.5
10	-0.37	-0.23	-0.1	0.55	74.7	16.6	3.8	1,132.5	13.7
11	-0.74	-0.42	-0.4	1.1	72.0	15.5	3.2	1,215.0	14.3
12	-1.15	-0.6	-0.8	1.65	68.9	14.4	2.4	1,297.5	13.6
13	-1.63	-0.8	-1.4	2.2	65.3	13.3	1.3	1,380.0	13.5

^aXanthophylls (g)/marigold flower flour (kg)

Table 4 Xanthophyll yields achieved for the experiments generated by the second 2^{4-1} experimental design. The operating conditions are encoded to emphasize differences

Run number	X_1 (moisture)	X_2 (agitation)	X_3 (aeration)	X_4 (marigold)	Xanthophyll yield ^a
14	-1	+1	-1	+1	8.5
15	-1	-1	+1	+1	12.5
16	+1	-1	+1	-1	14.5
17	+1	+1	+1	+1	17.4
18	+1	-1	-1	+1	14.2
19	+1	+1	-1	-1	8.7
20	-1	-1	-1	-1	13.5
21	-1	+1	+1	-1	15.2
22	0	0	0	0	13.1

^aXanthophylls (g)/marigold flower flour (kg)**Table 5** Variance analysis for the second 2^{4-1} design. $R^2=99.9$; standard error=0.036. *SS* Sum of squares, *DF*, degrees of freedom, *PV*, probability distribution values

Source variation	SS	DF	PV
Main effects			
Factor X_1 : moisture	3.3297	1	0.0128
Factor X_2 : agitation	2.9880	1	0.0135
Factor X_3 : aeration	27.266	1	0.0045
Factor X_4 : marigold	0.0965	1	0.0747
$X_1X_2=X_3X_4$	0.0189	1	0.1656
$X_1X_3=X_2X_4$	1.3888	1	0.0198
$X_1X_4=X_2X_3$	32.252	1	0.0041
Total error	0.0013	1	
Total	67.341	8	

 $[X_i]$

$$= 17.45 + 0.393A + 1.652B + 1.547C - 0.794AA + 0.898AB - 0.082AC - 1.345BB - 0.017BC - 2.382CC$$

This description was once again obtained via least squares from the 15 experimental runs of the Box-Behnken design. The model was also used to construct response plots (Fig. 2). These hinted at the presence of a global optimum: a set of operating conditions comprising the three variables that lead to a maximum response (xanthophylls yield). The location of the optimum provides a simple example in locating an extremum for a multidimensional system via derivation of the second-

order model and solution of the resulting set of linear equations:

$$\partial[X_i]\partial A = 0.393 - (2)0.794A + 0.898B - 0.082C = 0$$

$$\partial[X_i]\partial B = 1.652 + 0.898A - (2)1.345B - 0.017C = 0$$

$$\partial[X_i]\partial C = 1.547 - 0.082A + 0.017B - (2)2.382C = 0$$

The system solution is the following: $X_1=0.71$; $X_2=0.85$; and $X_3=0.31$. Using the transformation (X_i =optimum factor value [(factor upper boundary - factor lower boundary)/2] + mean factor value) the decoded factor values are obtained. This procedure indicates that the solid-state fermentation of marigold flowers should take place allowing for 73.8% moisture content in the system, intermittent agitation every 14.8 h, and 4.1 l inlet air/min in order to maximize the total xanthophylls extraction (Fig. 2).

Discussion

With the optimum values obtained by the optimization strategy, a verification run using these conditions resulted in a flour with 17.8 g total xanthophylls/kg (dry weight), which is similar to the amount predicted by the model (18.5 g/kg). This yield compares favorably with the commercial marigold flower flour obtained from commercial ensilage processes, which yield an average 11.54 ± 2 g xanthophylls/kg marigold flower flour (dry weight)

Table 6 Points on the second path of steepest ascent

Run number	Coded conditions				X_1 moisture (%)	X_2 agitation (h)	X_3 aeration (lpm)	X_4 marigold (g)	Xanthophyll yield ^a
	X_1	X_2	X_3	X_4					
22	0	0	0	0	70.0	15.0	2.5	1,250.0	13.1
23	0.2	-0.18	0.55	0.0	71.0	14.4	3.4	1,250.0	13.9
24	0.4	-0.32	0.99	0.0	72.0	13.9	4.2	1,250.0	14.5
25	0.6	-0.41	1.33	0.0	73.0	13.3	5.1	1,250.0	15.5
26	0.8	-0.47	1.59	0.0	74.0	12.7	5.9	1,250.0	15.2
27	1.0	-0.52	1.8	0.0	75.0	12.2	6.8	1,250.0	15.0

^aXanthophylls (g)/marigold flower flour (kg)

Table 7 Box–Behnken design and data obtained from experimental runs

Run number	X_1 (moisture)	X_2 (agitation)	X_3 (aeration)	Xanthophyll yield ^a
28	-1	-1	0	15.1
29	-1	+1	0	15.9
30	+1	-1	0	13.0
31	+1	+1	0	17.3
32	-1	0	-1	11.4
33	-1	0	+1	15.2
34	+1	0	-1	13.5
35	+1	0	+1	17.0
36	0	-1	-1	10.4
37	0	-1	+1	13.0
38	0	+1	-1	14.5
39	0	+1	+1	17.0
40	0	0	0	17.5
41	0	0	0	17.3
42	0	0	0	17.6

^aXanthophylls (g)/marigold flower flour (kg)

(Industries Alcosa S.A. de C.V., Celaya, Gto, Mexico). However, commercial ensilage requires a long processing time (nearly 4 weeks) to obtain such flour quality. A plausible explanation for the differences among xanthophylls concentrations in flour is the oxygen requirements of the saprophyte microorganisms. In previous work, we studied hydrolytic enzyme production by these microorganisms, especially *Rhizopus nigricans*, in both stirred vessels and bubble columns. The results showed that a high level of dissolved oxygen is needed to increase enzyme synthesis. Thus, it may be that oxygen depletion in the commercial ensilage process limits both synthesis and production of hydrolytic enzymes. The extracted oleoresin from marigold flower fermented in solid state was analyzed by HPLC to determine the concentration of its main components (Fig. 3). The concentrations of lutein (85.6%) and zeaxanthin (4.5%) compare favorably with those reported previously (Hadden et al. 1999; Navarrete-Bolaños et al. 2001).

The experiments described here demonstrate that solid-state fermentation processes are a viable alternative for improving the yield of xanthophylls extracted from marigold flower. The yield represents a 65% increase with respect to the average amount obtained using standard commercial processes, although it is also 25% smaller than that obtained in other studies (Delgado-Vargas and Paredes-López 1997; Navarrete-Bolaños et al. 2003). The difference may be attributed to variations both in the xanthophylls content of raw marigold and in the particular system used. Delgado-Vargas and Paredes-López (1997) and Navarrete-Bolaños et al. (2003) used only marigold flower petals, which have a higher xanthophylls content than the remaining flower parts (Shewmaker 2002). In our solid-state fermentation system, we used the whole marigold flower, including its receptacles. The latter comprises about 30% of the starting material, thus the overall yields are similar. Whole marigold flowers are used when the extraction products are provided as additives in poultry feed, because the

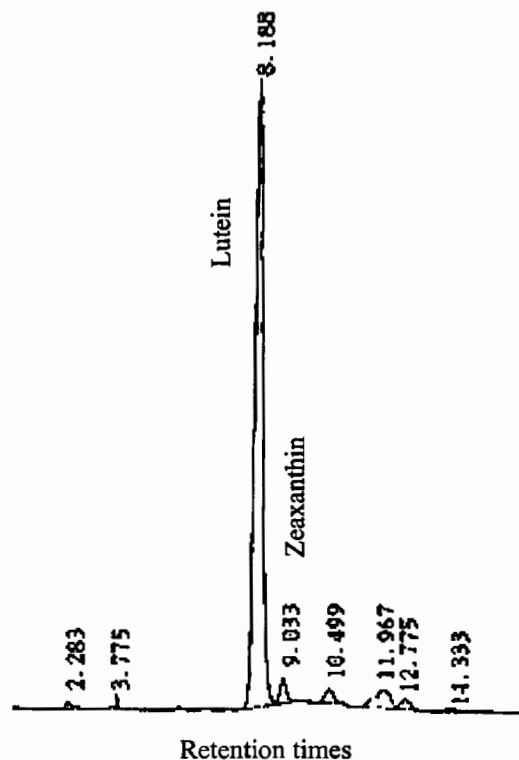


Fig. 3 HPLC chromatogram of the saponified oleoresin obtained as final product from fermented marigold flour

residual solid, after extraction, acts as a support for the saponified extract in the integration stage. In addition, although enzymatic treatments reduce processing time (Delgado-Vargas and Paredes-López 1997), their use is impractical because additional stages are required to remove the substantial amounts of water that are also needed. Furthermore, the capacity to process larger quantities of raw material is limited. The modular design of the solid-state fermentation system used in this work allows critical variables to be controlled and quantified.

When the system is run under optimum or near-optimum conditions, there is a significant increase in xanthophylls recovery from marigold flowers without loss or changes in the profiles of the main components.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support of SIHGO, COSNET, ANUIES-SUPERA, and technical assistance from Benjamín Quezada-Zavala, Neltzer Martínez-Abarca, Luis Miguel González-Calderón and Rosa Martha Figueroa-Vizcaíno.

References

- AOAC (1992) AOAC (1984) Official methods of the Association of Official Analytical Chemists, 14 th edn. Washington, DC
- Ausich RL, Sanders DJ (1997) Process for the formation, isolation and purification of comestible xanthophyll crystals from plants. US Patent 5,648,564
- 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
- Blether JK, Mitchell RP, Tugwell RL (1966) The effect of Eimeria maxima on broiler pigmentation. Poult Sci 45:689–694
- Chew BP, Wong MW, Wong TS (1996) Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. Anticancer Res 16:3689–3694
- 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
- Favati F, King JW, Friedrich JP (1998) Supercritical CO₂ extraction of carotene and lutein from leaf protein concentrates. J Food Sci 53:1532–1536
- Fullmer LA, Shao A (2001) The role of lutein in eye health and nutrition. Am Assoc Cereal Chem 46:408–413
- Gierhart DL (1994) Production of zeaxanthin and zeaxanthin-containing compositions. US Patent 5,308,759
- Hadden WL, Watkins RH, Levy LW, Regalado E, Rivadeneira DM, Van Breemen B, Schwartz SJ (1999) Carotenoid composition of marigold (*Tagetes erecta*) flower extract used as nutritional supplement. J Agric Food Chem 47:4189–4194
- Hencken H (1992) Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. Poult Sci 71:711–717
- Hirschberg J, Harker M (1999) Carotenoid-producing bacterial species and process for production of carotenoids using same. US Patent 5,935,808
- Jacobson GK, 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. US Patent 6,015,684
- Kanel JS, Marentis RT (2000) Process for fluid/dense gas extraction under enhanced solubility condition. US Patent 6,106,720
- Khachik F (1995) Process for isolation, purification, and recrystallization of lutein from saponified marigold oleoresin and uses thereof. US Patent 5,382,714
- Kreienbuhl P, Rudin P, Rudolph W (2000) Method of making carotenoids. US Patent 6,150,561
- Levi LW (2001) Trans-xanthophyll ester concentrates of enhanced purity and methods of making same. US Patent 6,191,293
- Madhavi DL, Kagan DI (2002) Process for the isolation of mixed carotenoids from plants. US Patent 6,380,442
- Martin KR, Eaille ML, Smith JC (1996) β -Carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant-induced damage. J Nutr 126:2098–2106
- Montgomery DC (1997) Response surface methods and other approaches to process optimization. Design and analysis of experiments. 4th edn. Wiley, NY, pp 372–422
- Naranjo-Modad S, López-Munguía A, Vilarem G, Gaset A, Bárcana E (2000) Solubility of purified lutein diesters obtained from *Tagetes erecta* in supercritical CO₂ and the effect of solvent modifiers. J Agric Food Chem 48:5640–5642
- Navarrete-Bolaños JL, Jiménez-Islas H, Rico-Martínez R, Domínguez-Domínguez J, Regalado-González C (2001) A statistically-based strategy for obtaining equilibrium data in xanthophylls lixiviation. J Food Sci 6:1143–1146
- Navarrete-Bolaños JL, Jiménez-Islas H, Rico-Martínez R, 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
- Philip T (1997) Purification of lutein-fatty acid esters from plant materials. US Patent 4,048,203
- 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
- Shewmaker CK (2002) Methods for producing carotenoid compounds, and specialty oils in plant seeds. US Patent 6,429,356
- Tyczkowski JK, Hamilton PB (1987) Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicosis in young chickens. Poult Sci 66:1184–1188
- Winstead CS, Meinecke CF, Miller A, Beasley JN, Skeeles K, Stephenson EL (1985) Factors related to the incidence of the malabsorption syndrome. Poult Sci 64:499
- Zhang LX, Coney RV, Bertram JS (1991) Carotenoids enhance gap functional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. Carcinogenesis 12:109–114

Improving Xanthophyll Extraction from Marigold Flower Using Cellulolytic Enzymes

JOSÉ LUIS NAVARRETE-BOLAÑOS,*†‡§ HUGO JIMÉNEZ-ISLAS,†
ENRIQUE BOTELLO-ALVAREZ,† RAMIRO RICO-MARTÍNEZ,†‡§ AND
OCTAVIO PAREDES-LÓPEZ§

Departamento de Ingeniería Química-Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Avenida Tecnológico s/n, C.P. 38010, Celaya, Gto., Mexico, and Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos (PROPAC), Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas s/n, C.P. 76010, Querétaro, Qro., Mexico

In this work is studied the effect of a noncommercial enzyme preparation on xanthophyll extraction from marigold flower (*Tagetes erecta*). The enzymatic extract was synthesized by endogenous microorganisms previously isolated and identified as *Flavobacterium I1b*, *Acinetobacter anitratus*, and *Rhizopus nigricans*. The results show that the extraction yield depends directly on the extent of the enzymatic hydrolysis of cell walls in the flower petals and that it is possible to reach yields in excess of those previously reported for treatments with commercially available enzymes (29.3 g/kg of dry weight). HPLC analysis of the product indicates that the original xanthophyll profile is not altered. The enhanced extraction system appears to be very competitive when compared to the traditional process and current alternatives.

KEYWORDS: Xanthophyll extraction; marigold flower; cellulolytic enzymes

INTRODUCTION

Marigold flower (*Tagetes erecta*) extract (oleoresin) is a product with increasing demand in international markets. The saponified extract is used as an additive to poultry feed (1–3) due to its pigmenting properties. Additional studies have shown that the marigold extracts may be used as a human nutritional supplement, based on important biological functions such as cancer prevention agent, ligament repair in muscular tissue, and prevention agent for age-related macular degeneration (4, 5). These applications have fostered the interest in improving xanthophyll production processes and developing new alternatives. These efforts had included chemical synthesis and fermentation technology, as well as the extraction from marigold flower (6–8). The commercial oleoresin production from marigold flower involves the following stages: ensilage, pressing, drying, hexane extraction, distillation, and saponification (9). Previous studies have shown that an enzymatic treatment of the marigold flower, based on cellulases, can advantageously improve xanthophyll extraction (10–12). Matoushek (10) described a process in which fresh flowers in water (10% w/v) were pretreated with cellulase, followed by the extraction using a solvent (chloroform or hexane). The author reports a 36% increase of yield, as compared to the control without enzyme treatment. Delgado-Vargas and Paredes-López (11) determined

the effects of solids content and the elimination of water-soluble substances on the carotenoid profiles of marigold samples treated with enzymes. Their results show that enzymatic treatment produced a flour with the highest *all-trans*-lutein content (25.1 g/kg of dry weight), an important increment when compared to a reference yield of 11.4 g/kg for the untreated control. In both cases, the proposed enzymatic treatments had practical limitations, namely, long reaction times and the removal of a substantial amount of water used in the enzymatic reaction. Bárzana et al. (12) proposed a simultaneous enzymatic treatment and solvent extraction. They used a set of hydrolytic enzymes that can degrade the cell wall components in a predominantly organic medium (i.e., hexane) with low humidity. Their results show that, in the absence of enzymes, 44% of the carotenoids can be recovered, whereas recoveries in excess of 85% can be obtained when the enzymes are mixed with the flower prior to extraction. Perhaps the main drawback in these efforts is the use of expensive commercial enzymes. In previous work (13), we studied marigold flower ensilage seeking to improve the xanthophyll extraction. There, we evaluated the use of a mixed culture, associated as normal microbiota of the marigold flower, as starter inoculum, reaching yields of 24.9 (± 0.04) g of xanthophylls/kg of flour (dry weight), similar to those previously reported for enzymatic treatments (11). In addition, we demonstrated that the endogenous microorganisms *Flavobacterium I1b*, *Acinetobacter anitratus*, and *Rhizopus nigricans* are the most significant in marigold flower ensilage and exhibit high cellulase activity. On the basis of the current knowledge regarding the

* Author to whom correspondence should be addressed [telephone (+52) 461 61 1 75 75; fax (+52) 461 61 1 79 79; e-mail jlnb@itc.mx].

† Instituto Tecnológico de Celaya.

‡ Universidad Autónoma de Querétaro.

ability of hydrolytic enzymes to act on structural cell wall degradation, the present study seeks to characterize the relationship between the polymer structural changes and the cellulase activity, which facilitate xanthophyll extraction. Here, we also report a novel pretreatment that allows, in a reasonable processing time, improved xanthophyll extraction yields.

MATERIALS AND METHODS

Fresh Material. Fresh marigold flowers (*T. erecta*) were supplied by Industrias Alcosa, S.A. de C.V. Guanajuato, Mexico. A single batch was used for all experiments. The flowers were separated from the receptacles, and the petals were mixed homogeneously. The petals obtained were divided in two sets; one was processed fresh, and the other portion was dehydrated at environmental conditions to 10% ($\pm 1\%$) moisture content.

Enzymatic Extract. For enzymatic activity studies, *F. Iib*, *A. anitratus*, and *R. nigricans* were propagated, according to the method of Navarrete et al. (13), to obtain a raw cellulase extract. The effects of cellulase, present in these extracts, on petals' structural wall breakdown, as well as the residual enzymatic activity via essays on a cellulose carboxymethyl (CCM, high viscosity; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) solution, were evaluated.

Commercial Cellulase. Commercial enzyme with endo-1,4- β -D-glucanase (EC 3.2.1.4 from *Aspergillus niger*, Sigma Chemical Co.) activity was used for enzymatic treatment. To compare against the enzyme extract produced by endogenous microorganisms, enzymatic solutions at 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, and 0.001% (w/v) were prepared and a calibration curve was constructed. The pH of all enzymatic solutions was adjusted to 5.0 (recommended by the manufacturer) with diluted hydrochloric acid (Beckman Instruments, Inc., Irvine, CA).

Enzymatic Activity for the Raw Enzymatic Extract and Commercial Cellulase Solutions. For both the commercial enzyme solutions and the raw enzymatic extracts, enzymatic activity assays involved the addition of 10 mL to 150 mL of a cellulose carboxymethyl solution of 5.25 g/L that presented a viscosity (η) of 2400 cP (Brookfield digital rheometer model DV-III+). The solutions obtained were kept on a rotary shaker at 28 °C and 175 rpm (Forma Scientific, model 4520) for 24 h. The enzymatic activity of these samples was measured indirectly as a function of viscosity reduction.

Structural Cell Wall Breakdown. To evaluate the effect of commercial cellulase and raw cellulase extract on the marigold petals, one set of Erlenmeyer flasks containing 10 g of fresh petals was blended with 120 mL of raw enzymatic extract or commercial cellulase solution. The samples were divided in two sets: The first set was kept on a rotary shaker at 28 °C and 175 rpm for 24 h, whereas the second set was kept at the same conditions but without agitation. Additional samples were prepared in the same manner using dry petals. Portions from all sets were taken at regular time intervals. These portions were filtered, and their solid and liquid phases were analyzed separately. The solid phases were dehydrated in a vacuum oven (Shel Laboratory, model 1430) to 10% ($\pm 1\%$) moisture content and milled (0.5-mm sieve) using a Brinkmann mill (Brinkmann, Westbury, NY). The flour obtained was analyzed according to AOAC method 970.64 (14) to determine the total xanthophylls concentration. In addition, fiber acid detergent (15) for quantifying lignin and cellulose, fiber neutral detergent (16) for quantifying wall cell components and cell content, and lignin neutral detergent (15) for quantifying lignin were also measured. The liquid phases obtained were used to evaluate the residual enzymatic activity, as described below.

Residual Enzymatic Activity. Aliquots of 10 mL from the liquid phase of the processed marigold flower samples were added to 150 mL of a cellulose carboxymethyl solution of 5.25 g/L (2400 cP). The solutions obtained were kept on a rotary shaker at 28 °C and 175 rpm for 24 h. The residual enzymatic activity of these samples was measured, once again, indirectly as a function of viscosity reduction.

Sample Preparation for High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis. Treated marigold flower samples were dried in a vacuum oven (Shel Laboratory, model 1430) to 10% ($\pm 1\%$) moisture content. The dried samples were extracted with a mixture of

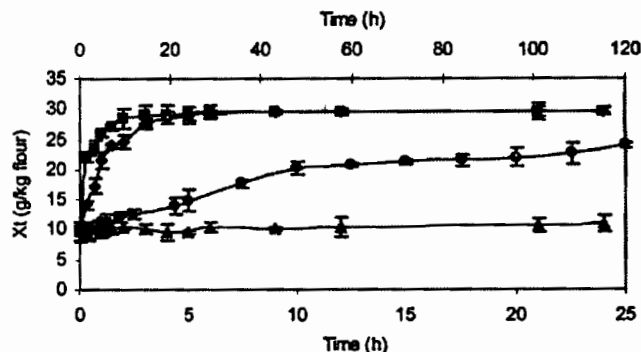


Figure 1. Effect of enzymatic treatment on xanthophyll concentration in agitated systems: treatment with raw enzymatic extract on dry petals (■) and fresh petals (◆); treatment with commercial enzyme on dry petals (●) and fresh petals (▲).

hexane, ethanol, acetone, and toluene (HEAT) of analytical grade (J. T. Baker, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, NJ) under mild conditions (56 °C during 45 min). When the extraction was finished, the liquid phase was separated by centrifugation at 6000 rpm (Hermle Z383 K), mixed with a solution of potassium hydroxide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in methanol (40% w/v), and kept during 20 min at 56 °C for saponification. The resulting solution was dissolved in hexane and sodium sulfite (Sigma Chemical Co.) solution (10% w/v). After settling, the immiscible phases were separated. The light phase (that contains the free xanthophylls) was used in the HPLC analysis.

HPLC. The equipment used for the HPLC essays was a Varian chromatograph model 9050 equipped with a quaternary pump solvent delivery and degassing system. Samples consisting of 20 μ L of saponified pigment were injected. The analysis of carotenoids was performed using a silica OH column (SGE BPX5 from SGE International). The solvent elution was operated at 1.0 mL/min of a mixture containing 66.5% hexane, 1.5% 2-propanol, and 32.0% ethyl acetate. The separation was performed at room temperature. The pigments were monitored using a 447 nm detector and 1 s and 2 nm as time and wavelength resolutions, respectively. Each peak on the chromatogram was associated with a particular component by retention time comparison, and the component profile was obtained using the relative percentage of HPLC chromatogram area.

The experimental results described below were performed in duplicate, and the reported values represent the mean values of these duplicated experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

Cellulase Activity of Extract from Endogenous Microorganisms. The results of viscosity reduction on CCM solutions showed that the quantity of enzyme synthesized by the endogenous microorganisms corresponds to the commercial enzyme solutions of 0.05 (± 0.01)% (w/v).

Enzymatic Treatment Effect on Xanthophyll Yield. The xanthophyll concentration in the flours obtained via raw enzyme extract treatment shows an increase clearly correlated to the enzymatic activity. For the samples incubated with agitation, the increase appears to be independent from the condition of the petals (Figure 1). Flours with 29.0 (± 0.1) g of total xanthophylls/kg of flour (dry weight) can be obtained after 5 h of treatment on fresh petals. Additional processing did not affect the xanthophyll concentration in the flours. Similar behavior was observed on the samples formed by dry petal samples (Figure 1). Flours with 29.3 (± 0.1) g of total xanthophylls/kg of flour (dry weight) can be obtained in the same treatment time. Nevertheless, Figure 1 also shows that the enzymatic extract acts more rapidly on the dry petals than on the fresh petals. Similar studies using a commercial enzyme solution of 0.05% (w/v) were realized, and the results showed that it is possible

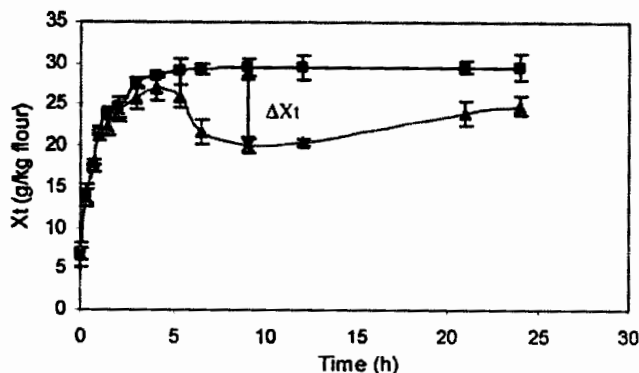


Figure 2. Effect of enzymatic treatment in agitated systems using the raw enzymatic extract on fresh petals: treatment with efficient filtration system to prevent xanthophyll losses (■); treatment coupled with a loose filtration system (▲).

to obtain a marigold flower flour with 23.9 (± 0.1) g of total xanthophylls/kg of flour (dry weight) in 120 h of treatment on marigold flower dry petals (Figure 1). These results compare favorably with those reported by Delgado-Vargas and Paredes-López (11); the differences observed are not significant and can be attributed to uncontrolled variables such as the variety and degree of maturity of flower and cellulase activity type. We note that the enzymatic treatment, using the raw enzymatic extract, reduces the processing time by $\sim 95\%$ ($\pm 1\%$) compared to the enzymatic treatment using commercial enzyme. In addition, the use of commercial enzyme did not affect the xanthophyll yield from fresh marigold flower petals with respect to that of the untreated samples, also described by Delgado-Vargas and Paredes-López (11). At first, this behavior was attributed to cell wall modification during the drying process of the petals; however, the treatment using raw enzymatic extract from the proposed endogenous culture allowed us to obtain marigold flower flour with high xanthophyll concentration also using fresh petals. Currently, we do not have a logical explanation for the failure of the commercial enzyme preparation to affect the yield from fresh flowers. We believe that the enzymatic extract synthesized by the endogenous microorganisms contains, in addition to cellulase, other enzymes that facilitate cellulase activity on cell wall petals.

Enzymatic Treatment Effect on Marigold Flower Petals.

Visual inspection of the samples treated, after 1.5 h, reveals the presence of fine petal particles suspended in the supernatant, resulting from the hydrolytic enzymes activity. After this time, we observed a gradual increase in the suspended solid material directly correlated to the treatment time. At ~ 5 h of treatment, the petals' structure has been totally destroyed and the maximum xanthophyll concentration has been reached (Figure 2). However, if the product obtained after 5 h of treatment is not adequately separated, up to 30% of the xanthophylls may be lost (ΔX_i , Figure 2). Such observation is consistent with previous findings (12), where inefficiencies of the traditional commercial extraction (ensilage-based) were declared. Nevertheless, the losses in the enzymatic treatment system can be partially reduced. Such recovery involves a loose filtration stage in which the xanthophyll-rich liquid phase is separated from the leached solid. As the solid particles are accumulated on the filter, forming a cake, one observes better xanthophyll recovery due to the presence of the cake, which acts as a secondary barrier for filtration. However, full recovery was never reached (Figure 2). Additional pressure was needed to prevent the xanthophyll from being retained in the cake.

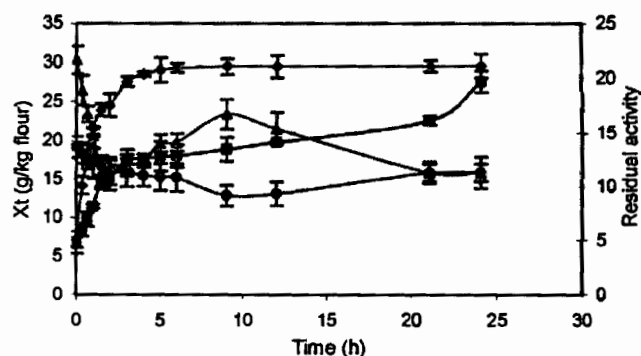


Figure 3. Effect of enzymatic treatment on xanthophyll concentration on fresh petals for nonagitated samples (left axis, ■) and agitated samples (left axis, ◆) and changes in the residual enzymatic activity as measured via the reduction of CCM solutions for nonagitated samples (right axis, ●) and agitated samples (right axis, ▲).

To evaluate the residual enzyme activity during the essays, treated samples were filtered to separate the phases; supernatant aliquots were added to CCM solutions to evaluate the residual enzymatic activity. The results showed that the viscosity of the CCM solution diminished steadily during the first 1.5 h, correlated with the increase in the yield values (Figure 3). Apparently, viscosity reduction in the CCM solutions is associated with enzyme adsorption into the petals, leading to the yield increase, as the result of the enzymatic activity. During the following 7.5 h of the treatment, the residual enzymatic activity gradually recovers, reaching 80% ($\pm 2\%$) of its original value at zero time (Figure 3). Apparently, the enzyme activity increases due to enzyme desorption, characterized by changes in the solid structure and an increase of suspended particles in the supernatant. However, we do not observe further recovery of the enzymatic activity beyond 9 h of treatment. Seemingly, this behavior may be related to the enzyme being trapped in the solid phase when the samples were filtered, similar to the phenomena observed for the loose filtration mentioned above.

Likewise, the nonagitated samples showed lower yields for the same treatment times (Figure 3). Yields similar (27.5 g of total xanthophylls/kg of flour in dry weight) to those obtained on agitated systems are observed only after ~ 24 h of treatment (Figure 3). Figure 3 shows trends related to adsorption and activity similar to those observed for agitated samples. However, in nonagitated samples one never observes the total degradation of petals characterized by the presence of particles in the supernatant; furthermore, the residual enzymatic activity did not exhibit any significant recovery.

From these results, we can conclude that agitation plays an important role in the enzymatic treatment system. It favors the adsorption, activity, and desorption of the enzyme, maximizing the efficiency and extraction yields. Agitation appears to facilitate enzyme diffusion from the supernatant (liquid phase) to the marigold flower petals (solid phase). The fast enzyme adsorption accelerates the cell wall lysis, leading to an increase in the yield extraction. In addition, the agitation favors the pulverization of solid material. Pulverization leads to an increase in the interfacial area available for enzyme desorption. A speedy enzyme desorption is a desirable characteristic for the separation, recovery, and reutilization steps.

Enzyme Treatment Effect on Cell Wall Structural Components. Agitated samples from treated fresh petals were analyzed at different process times to estimate profile changes in the structural components in petal cell walls. The neutral detergent fiber (NDF) fraction was quantified as described by

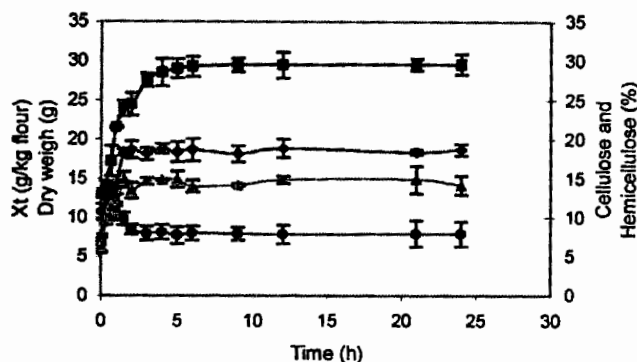


Figure 4. Effect of raw enzymatic extract on fresh petal composition [cellulose (◆) and hemicellulose (▲) right axis], weight loss in the solid phase [(●), left axis], and xanthophyll concentration [(■), left axis].

Van Soest and Wine (15), whereas cellular content fraction was determined by the difference (1 - NDF). The acid detergent fiber (ADF) fraction, in turn, was quantified as described by Van Soest (16). The ADF residue was treated with sulfuric acid (72%) to obtain the lignin detergent (LD) fraction (16). The difference (NDF - ADF) represents the hemicellulose content, and the ADF - LD fraction was identified as cellulose content.

The results (Figure 4) showed that, for the agitated samples, cellulose and hemicellulose curves are very similar to the xanthophyll yield curve. This characteristic trend supports the simultaneous occurrence of enzyme adsorption and activity. The change in the cellulose and hemicellulose content appears to be correlated with the permeability change in the cell walls during the treatment, easing mass transfer between the solid phase (petals) and the liquid phase (enzymatic extract). During the process, the solid-phase mass diminishes steadily. As a result, the insoluble components (i.e., xanthophylls) increase their concentration in the solid phase. Such phenomena are further confirmed by the weight change in the samples (Figure 4).

The overall analysis of these results appears to suggest that the adsorption-reaction stages are the limiting ones, and they are enhanced via agitation. As a consequence, higher extraction yields and substantial reduction in processing time are achieved for the agitated samples. In this study, the overall data analysis shows that the treatment time should be ~5 h. At this time the maximum xanthophyll extraction yield is obtained, the xanthophyll loss to the liquid phase can be minimized, the substrate for hydrolytic activity of the enzyme has been depleted, the interfacial area has been maximized, and the enzyme has desorbed from the solid. Although we did not explore this issue, enzyme recovery could be started at such time for reuse.

HPLC Analysis. Flours obtained from the enzymatic treatment in the agitated system were analyzed by HPLC to determine the concentration and profile of the main components. The chromatogram showed (Figure 5) that the main components are lutein (84.7%) and zeaxanthin (4.5%). This analysis, by comparison with previously reported profiles (17), indicates that the concentrations are preserved.

Conclusion. The results presented here confirm that xanthophyll extraction from marigold flower can be improved using cellulolytic enzymes. Flours with high contents of xanthophylls (29.3 g of total xanthophylls/kg, dry weight) can be obtained after only 5 h of treatment, using the raw enzymatic extract synthesized from *F. Iib*, *A. anitratus*, and *R. nigricans*, in an agitated system. Clearly, the process described in this study has significant advantages when compared to the traditional commercial processes and similar previous studies: (1) the treatment with hydrolytic enzyme synthesized by microorganisms associ-

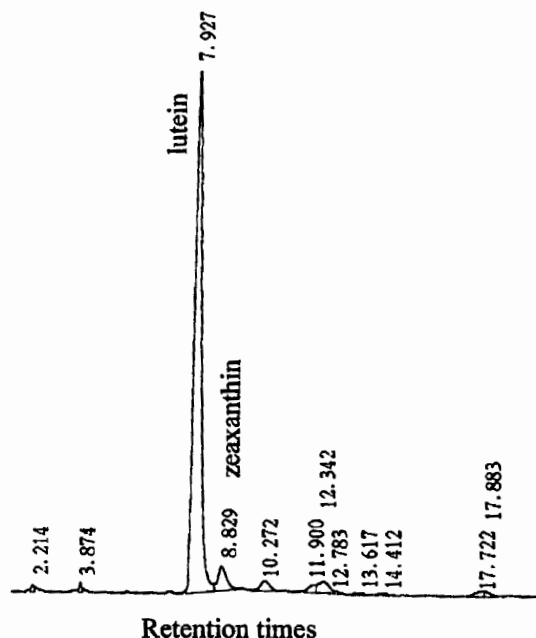


Figure 5. HPLC chromatogram of the saponified oleoresin obtained as final product from treated marigold flower flour.

ated as normal flora of the marigold flower is more cost-efficient due in part to the straightforward enzyme synthesis, and (2) a substantial reduction in processing time can be achieved while attaining high xanthophyll content. The on-site enzyme production and process time reduction are decisive characteristics when the economic viability of the process is evaluated. Furthermore, HPLC analysis of the flour obtained from this treatment shows no alteration in the total xanthophyll profile and composition. The identified processing time (5 h) and proportion of substrate to enzymatic extract volume (10% w/v) reported here are the first steps toward the design of more efficient continuous or semicontinuous processes that are currently being investigated.

ACKNOWLEDGMENT

We gratefully acknowledge technical assistance provided by Rosa Martha Figueroa-Vizcaino, Janet Zavala-Nigoa, and Claudia L. Rangel-Cruz.

LITERATURE CITED

- (1) Hencken, H. Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation. *Poult. Sci.* **1992**, *71*, 711-717.
- (2) Tyczkowski, J. K.; Hamilton, P. B. Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicosis in young chickens. *Poult. Sci.* **1987**, *66*, 1184-1188.
- (3) Hari, R. K.; Patel, T. R.; Martín, A. M. An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Rev. Int.* **1994**, *10* (1), 49-79.
- (4) Fullmer, L. A.; Shao, A. The role of lutein in eye health and nutrition. *Am. Assoc. Cereal Chem.* **2001**, *46* (9), 408-413.
- (5) Seddon, J. M.; Ajani, U. A.; Sperduto, R. D.; Hiller, R.; Blair, N.; Burton, T. C.; Farber, M. D.; Gragoudas, E. S.; Haller, J.; Miller, D. T.; Yannuzzi, L. A.; Willett, W. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E, and advanced age-related macular degeneration. A multicenter study. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* **1994**, *272*, 1413-1420.
- (6) Krienbuhl, P.; Rudin, P.; Rudolph, W. Method of making carotenoids. U.S. Patent 6,150,561, 2000.

- (7) Jacobson, G. K.; Jolly, S. O.; Sedmak, J. J.; Skatrud, T. J.; Wasileski, J. M. Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma* method for their cultivation and their use in animal feeds. U.S. Patent 6,015,684, 2000.
- (8) Khachik, F. Process for extraction and purification of lutein, zeaxanthin and rare carotenoids from marigold flowers and plants. U.S. Patent 6,262,284, 2001.
- (9) Industrias Alcosa S.A. de C.V., Celaya Gto., Mexico, 1998.
- (10) Matoushek, R. F. Xanthophylls extraction process. U.S. Patent 3,783,099, 1974.
- (11) Delgado-Vargas F.; Paredes-López O. Effects of enzymatic treatments of marigold flowers on lutein isomeric profiles. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1097–1102.
- (12) Bárzana, E.; Rubio, D.; Santamaría, R. I.; García-Correa, O.; García, F.; Ridaura-Sanz, V. E.; López-Munguía, A. Enzyme-Mediated Solvent Extraction of Carotenoids from Marigold Flower (*Tagetes erecta*). *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4491–4496.
- (13) Navarrete-Bolaños, J. L.; Jimenez-Islas, H.; Botello-Alvarez, E.; Rico-Martinez, R. Mixed culture optimization for marigold flower ensilage via experimental design and response surface methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2206–2211
- (14) AOAC. *Official Methods of Analysis*, 14th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, 1984.
- (15) Van Soest, P. J.; Wine, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. The determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1967**, *50*, 50–56.
- (16) Van Soest, P. J.; Wine, R. H. The determination of lignin and cellulose in acid detergent fiber with permanganate. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1968**, *51*, 780–787.
- (17) Navarrete-Bolaños, J. L.; Jimenez-Islas, H.; Rico-Martinez, R.; Dominguez-Dominguez, J.; Regalado-González, C. A statistically based strategy for obtaining equilibrium data in xanthophylls lixiviation. *J. Food Sci.* **2001**, *66*, 1143–1146.

Received for review October 4, 2003. Revised manuscript received March 11, 2004. Accepted April 1, 2004. We gratefully acknowledge financial support by FOMIX (CONACYT/CONCYTEG; 02-09-B-005) and COSNET (896.03-P).

JF0351366