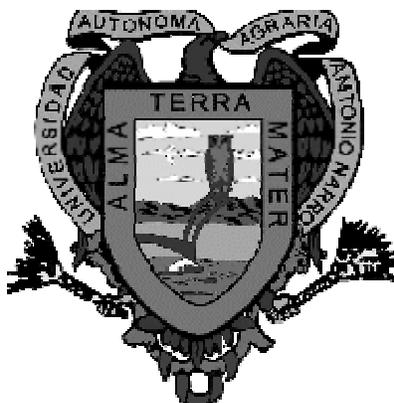


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

DIVISION DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Tesis:

Efecto de los factores pH y temperatura sobre la producción de ácido elágico en cultivo en medio líquido por *Aspergillus niger* GH1, usando extracto de cáscara de granada (*Punica granatum*).

Presentada por
Francisco Virgilio Cruz Antonio

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:
Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Buenavista, Saltillo, Coahuila. México

Agosto 2009

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

Efecto de los factores pH y temperatura sobre la producción de ácido elálgico en cultivo en medio líquido por *Aspergillus niger* GH1, usando extracto de cáscara de granada (*Punica granatum*).

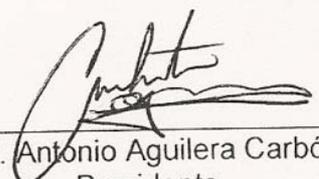
Presentada por
Francisco Virgilio Cruz Antonio

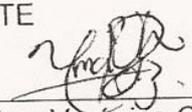
Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

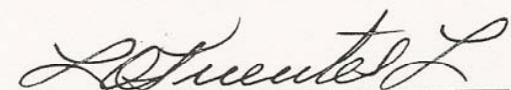
APROBADA

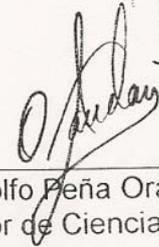
ATENTAMENTE


Dr. Antonio Aguilera Carbó
Presidente


Dra. Ana Verónica Charles Rodríguez
Vocal


Dr. Heliodoro de la Garza
Vocal


Lic. Laura Olivia Fuentes Lara
Vocal


Ing. Rodolfo Peña Oranday
Coordinador de Ciencia Animal

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



COORDINACION DE
CIENCIA ANIMAL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
"ANTONIO NARRO"
DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

TESIS

Efecto de los factores pH y temperatura sobre la producción de ácido elálgico en cultivo en medio líquido por *Aspergillus niger* GH1, usando extracto de cáscara de granada (*Punica granatum*).

Presentada por
Francisco Virgilio Cruz Antonio

Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador Como Requisito Parcial Para Obtener el Título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Fue dirigida por el siguiente comité:

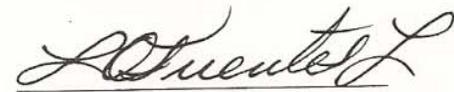
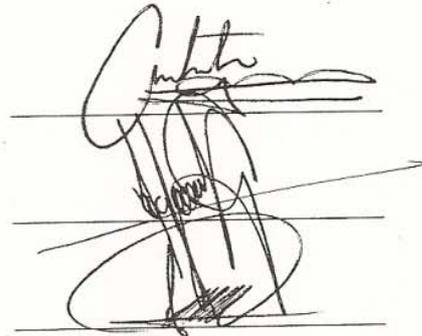
Dr. Antonio Fco. Aguilera Carbó

Dr. Cristóbal Noé Aguilar González

Dr. Heliodoro de la Garza Toledo

Lic. Laura Olivia Fuentes Lara

M.C Juan Simón Hernández Rivera



Juan Simón Hernández Rivera

DEDICATORIA

A NUESTRO DIOS PADRE:

Por haberme dado la dicha de ver la luz del día y por ser el arquitecto de mi propio destino que se construye diariamente, de facilitarme y darme la esperanza de culminar una meta mas de mi vida profesional, y por darme una vida llena de amor, cariño, fe y esperanza con mi familia y demás amistades.

Con mucho cariño, respeto y orgullo a mis padres:

Sra. Antonieta Antonio Hernández.

Sr. Mucio Márquez Marcelino.

Sr. Virgilio Cruz Manuel.

(+)

A **ella**, que día a día a luchado, ha llorado, se ha preocupado para que nosotros sus frutos seamos personas de bien y compartibles en cualquier circunstancia. Gracias **Madre**, por tu apoyo incondicional y tu confianza que has depositado en mí en todo momento; que con la ayuda de tus rezos y suplicas me han motivado para salir adelante ante todo.

A **él**, a quien conociéndolo ya toda una vida, aunque no siendo sus hijos genéticos si no de crianza, se preocupo por el bien estar de cada uno de la familia, y dedico con todo mi amor para ti Padrastro, quien eres mi más ejemplo y admiración por seguir cosechando triunfos en la vida.

Gracias **Sr. Virgilio Cruz Manuel.**

A **él**, que no tuve la dicha de conocerlo físicamente, pero estoy tiernamente agradecido por haberme fecundado y darme la vida. Padre donde quiera que estés, muchas gracias de todo corazón.

A mis abuelitos:

Jovita Manuel Jiménez

Francisca Hernández De la Cruz (+)

Fortunato Cruz Martínez

Hilario Antonio Guadalupe

Por sus consejos bondadosos y su amor incomparable.

A mis hermanos:

Everardo, Eder y Neisser. Quienes siempre han estado a mi lado, y han respetado mis decisiones en cualquier circunstancia, siempre orientándome por el camino correcto, además de poner su grano de arena para finalizar un eslabón más de la vida profesional.

A mis tías (os)

Francisca Antonio Hernández, Eugenia Antonio Hernández, Ma. Guadalupe Antonio Hernández, Rosalía Antonio Hernández, Julia Vicencio Martínez, Yolanda Juan Antonio, Juan Antonio Hernández, Erasto Antonio Hernández, Justino Cruz Manuel. Por estar siempre atentos a mis necesidades y por su confianza.

A mis primos

Jhovanny Alain, Beto, Francisco de Jesús, Luis Gerardo, Miguel, Javier, Juan, Christopher, Itzel Alejandra, Norma, Gladis y Ericka.

A mis cuñadas:

Brenda Cristina Cardona Mata.

Beatriz Fonseca Sanchez.

Gracias por apoyarme en todo momento por eso y, mas muchas gracias.

A mis sobrinitas:

Dana Tonantzi Cruz Cardona

Citlali Cruz Fonseca

A mis amigos y compañeros de la UAAAN y de la UAdeC:

Hugo Edgar, Guillermo, Julio (Tafolla), Omar, Octavio, Martin, Jesús, Juan, Enrique, Gerardo, Adrian, Romeo, Emilio, Armando, Alejandro, Toulouse, Elena, Carolina, Lusvia, Brenda, Aricelda, Beatriz, Iris, Lizbeth, Alejandra, Paola, Guísela, Lupe, Lucero, Adriana, Idalia, Alicia, Mónica, Caro, Mayela, Esmeralda, Paola, Veana, Marisol, Alejandra, Rosi, Ayerim, Emilio,

Leonardo, Víctor, Joel, Luis (wicho), Ascacio (cacho), Mike (sucio), Simon (chilo), Diego (gordo).

A mis amigos de la infancia:

José Alfredo (pechis), Vladimir (vladi), Hernán Osmin, Francisco Javier (pinto), Eder (molotes), Eloy, Leobardo, Oscar Aurelio, Eduardo (panzas), Ezequiel (cheques), Karina, Oralia, Beatriz, Viridiana, Mariel, Yolanda.

A estas personas apreciables:

Nelcy Analicia Flores Cruz, gracias amiga por estar siempre conmigo, alentándome con tus palabras de ánimo, diciéndome animo vir, si se puede no te desesperes, gracia amiga bonita, por eso y más de corazón mil gracias.

Hugo Edgar de la Cruz García, gracias por brindarme tu amistad dentro y fuera del narro querido amigo y por estar en todo momento en las buenas y en las malas a mis necesidades gracias amigo.

Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó, gracias Toni por ser mi compañero-amigo, por estrecharme y brindarme tu amistad, y sobre todo por ser parte fundamental del culmino de dicha investigación, no tengo palabras para agradecerte todo lo que hiciste y has hecho por mí el cual estaré por siempre agradecido, de todo corazón muchas gracias.

T.L.Q Carlos Alberto Arévalo Sanmiguel, el cual me brindo su amistad, su apoyo, sus consejos, por eso y más muchas gracias amigo.

A la familia Cardona Mata

El Ing. Fernando Cardona Arévalo, La Sra. M^a Guadalupe Mata, Fernando, Cesar, Brenda Cristina, Thelma. Gracias por su amistad y estar también presentes a mis necesidades de corazón muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

A mi “Alma Terra Mater” por haberme formado como profesionista en la Licenciatura de Ingeniero en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Al Dr. Antonio Francisco Aguilera Carbó, por su positivismo y motivación en la presente elaboración de dicha investigación, su ayuda, su paciencia y sobre todo por brindarme sus conocimientos para el término de la misma.

Al Dr. Cristóbal Noé Aguilar González, por brindarme la oportunidad de ver cristalizado mi anhelo de superación y por su apoyo incontenible para el culmino del presente proyecto de investigación.

Al Dr. Heliodoro de la Garza Toledo, por, sus conocimientos y su valioso apoyo para el término del presente proyecto de investigación gracias padrino.

A la Lic. Laura Olivia fuentes rodríguez, por su apoyo incondicional en el uso del laboratorio de Nutrición y Alimentos, mil gracias.

Al TLQ Carlos Alberto Arévalo Sanmiguel por su valiosa ayuda y paciencia mostrada en el laboratorio gracias.

Gracias al DIA

Por brindarme las facilidades en la culminación de la presente investigación. (Laboratorio: Fermentaciones, Biología molecular, Bioquímica y Microbiología)

A todas las personas que confiaron en mí y no haya podido alcanzar a nombrar de corazón mil gracias.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos	4
1.3 Justificación	5
1.4 Hipótesis	6
2. REVISIÓN DE LITERATURA	7
2.1 Generalidades de los taninos	7
2.2 Clasificación de los taninos	8
2.2.1 Galotaninos	8
2.2.2 Taninos complejos	8
2.2.3 Taninos condensados	8
2.2.4 Elagitaninos	8
2.3 Importancia de los taninos	9
2.3.1 Importancia biológica	9
2.3.2 Importancia industrial	10
2.4 Fuentes de obtención de taninos	10
2.5 Fuentes de obtención de elagitaninos y ácido elágico	11
2.6 Biosíntesis de elagitaninos y ácido elágico	14
2.6.1 Elagitaninos	15
2.6.2 Ácido elágico	16
2.7 Propiedades del ácido elágico	17
2.7.1 Propiedades industriales	17
2.7.2 Aplicaciones médicas	18
2.7.3 Actividad antioxidante	18
2.7.4 Actividad anti-lipoxidación o disminución de LDL	19
2.7.5 Actividad anti-mutagénica y anti-carcinogénica	19
2.7.6 Actividad anti-microbiana	20
2.7.7 Actividad antiviral	20
2.7.8 Actividad gastroprotectiva	21
2.7.9 Reducción de los niveles de glucosa	21
2.8 Biodegradación de elagitaninos	21
2.9 Procesos de extracción de elagitaninos.	24
2.10 Sistemas de cultivo	25
2.10.1 Cultivo en medio líquido	25
2.10.2 Cultivo en estado sólido	26
2.10.3 Efecto de la temperatura	27
2.10.4 Efecto del pH	27
2.11 Métodos de cuantificación de ácido elágico	27
2.11.1 Cuantificación de compuestos fenólicos	28
2.11.2 Técnicas espectrofotométricas	28
2.11.3 Técnicas cromatográficas	28
2.12 Generalidades del material vegetal empleado	30
2.12.1 Granada (<i>punica granatum</i>)	30

2.12.2 Usos tradicionales de la granada	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 Obtención del material vegetal	32
3.1.1 Preparación del extracto de cáscara de granada	32
3.2 Caracterización Físico-Química (análisis proximal)	32
3.2.1 Determinación de materia seca total	32
3.2.2 Humedad	33
3.2.3 Proteína cruda	33
3.2.4 Lípidos (Extracto etéreo)	33
3.2.5 Fibra cruda	34
3.2.6 Cenizas	34
3.3 Propagación y conteo de esporas	35
3.3.1 Condiciones de cultivo líquido	35
3.3.2 Recuperación del extracto enzimático	36
3.4 Técnicas analíticas	36
3.4.1 Determinación de biomasa	36
3.4.2 Azúcares totales (Dubois, 1956)	36
3.4.3 Determinaciones de fenoles hidrolizables totales (Makkar, 1993)	37
3.4.4 Cuantificación de ácido elágico	37
3.4.5 Actividad enzimática degradante de elagitaninos.	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
4.1 Caracterización físico química de la cáscara de granada	39
4.2 Resultados en graficas de pH, biomasa, azucars totales, fenoles hidrolizables totales, ácido elágico, actividad enzimática elagitanasa a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C	40
4.3 Resultados en graficas de pH, biomasa, azucars totales, fenoles hidrolizables totales, ácido elágico, actividad enzimática elagitanasa a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C	42
4.4 Evolución del pH en cultivo en medio líquido a 30 y 35 °C	45
4.4.1 Producción de biomasa a pH 3.5, 4.5 5.5 a 30 y 35 °C	46
4.4.2 Consumo de sustrato como azúcares totales a pH 3.5, 4.5 5.5 a 30 y 35 °C	46
4.4.3 Consumo de fenoles hidrolizables totales a pH 3.5, 4.5 5.5 a 30 y 35 °C	48
4.4.4 Acumulación de ácido elágico y actividad elagitanasa a pH 3.5, 4.5 5.5 a 30 y 35 °C	49
5. CONCLUSIONES	52
6. PERSPECTIVAS	53
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO		PÁGINA
1	Distribución de los taninos en el reino vegetal	10
2	Fuentes vegetales de elagitaninos y ácido elálgico	12
3	Otras fuentes potenciales de obtención de elagitaninos	14
4	Aplicaciones industriales de los elagitaninos	18
5	Sustancias para la extracción de elagitaninos	25
6	Caracterización físico-química de la cascara de granada (Robledo-Olivo, A. 2007).	31
7	Forma de realización de la actividad enzimática elagitanasa	38
8	Caracterización físico químico de la cascara de granada en el experimento.	39

FIGURA		PÁGINA
1	Posibles acoplamientos de la D-glucopiranososa en 1C_4 o 4C_1 con la conformación de unidades HHDP en (S)- o (R)-	16
2	Estructura del ácido elálgico	16
3	Curva cinética del potencia hidrogeno a diferentes pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C	40
4	Curva cinética de producción de biomasa en función del tiempo, pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C	40
5	Consumo de azúcares totales por <i>A. niger</i> GH1 durante la fermentación a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C	41
6	Consumo de polifenoles totales por <i>A. niger</i> GH1 durante la fermentación a pH' de 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C	41
7	Liberación de ácido elálgico y actividad enzimática durante por <i>A. niger</i> GH1, durante la fermentación a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C	42
8	Curva cinética del potencial de hidrogeno a diferentes pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C	42
9	Curva cinética de producción de biomasa en función del tiempo, pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C	43
10	Consumo de azúcares totales por <i>A. niger</i> GH1 durante la fermentación a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C	43
11	Consumo de polifenoles totales por <i>A. niger</i> GH1 durante la fermentación a pH' de 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C	44
12	Liberación de ácido elálgico y actividad enzimática durante por <i>A. niger</i> GH1, durante la fermentación a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C	44

RESUMEN

La presente investigación se realizó la caracterización físico química de la cáscara de granada, además se evaluó la influencia del pH y la temperatura sobre la producción de ácido elágico en cultivo en fermentación en estado líquido, usando la cepa de *Aspergillus niger* GH1 y el extracto de cáscara de granada como fuente de elagitaninos, se evaluaron tres rangos de pH (3.5, 4.5 y 5.5) y dos temperaturas (30 y 35 °C), con un nivel de inóculo de 1×10^6 , agitación de 200 rpm. Los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización físico química muestran que de acuerdo con la literatura este material tiene las características para ser empleado como sustrato para la fermentación, en cuanto a la concentración de azúcares totales (28 gL^{-1}), elagitaninos totales (20.3 gL^{-1}), además de otros componentes de importancia. Los resultados de la fermentación en medio líquido muestran que las mejores condiciones para la producción de ácido elágico son a pH de 3.5 y 30 °C con una concentración de 197.4 mgL^{-1} , también a estas condiciones se obtuvo la mayor expresión de la enzima elagitanasa (141.2 UL^{-1}), la cual está relacionada con la liberación del ácido elágico.

PALABRAS CLAVE: pH, Temperatura, fermentación líquida, ácido elágico.

1 INTRODUCCIÓN

El ácido elágico es una molécula de naturaleza fenólica que puede estar presente en forma libre en algunas especies vegetales como producto del metabolismo de las mismas, o bien puede encontrarse a partir de sus precursores, los elagitaninos. El subgrupo de los elagitaninos pertenece a un gran grupo de compuestos polifenólicos conocidos como taninos, que también provienen del metabolismo secundario de los vegetales. Los elagitaninos poseen en su estructura un grupo conocido como HHDP (6´6 dicarbonil 3´3, 4´4, 5´5 hexahidroxidifénico o bien, ácido hexahidroxidifénico), el cuál es característico de los elagitaninos, y que cuando se encuentran en presencia de ácidos o bases fuertes se hidroliza y se libera el ácido HHDP de los elagitaninos, el cual, sufre una reacción de lactonización espontánea que da origen a la molécula conocida como ácido elágico.

El ácido elágico es una molécula muy estable, tiene un punto de fusión de 362 °C (Bala y col., 2005), por su naturaleza fenólica tiende a reaccionar

formando complejos con otras moléculas como proteínas, alcaloides y polisacáridos. En vista de éstas propiedades que posee el ácido elágico con el paso del tiempo se han realizado distintos trabajos de investigación sobre la producción de ácido elágico por procesos biotecnológicos trabajos como el reportado por Huang y colaboradores en el 2005, Vattem y Shetty en el 2003.

Se ha encontrado que el ácido elágico posee actividad contra agentes nocivos para la salud, como lo son los radicales libres, que son los responsables de procesos como la oxidación que promueve el envejecimiento de las células del organismo, la presencia de radicales libres también representa un riesgo en la formación de tumores y distintas formas de cáncer, el ácido elágico se ha reportado como un producto efectivo en contra de estos agentes (Feldman y col., 1999; Ito y col., 1999; Martens-Talcott y col., 2003).

Las propiedades del ácido elágico también son aprovechadas en la industria de los alimentos, elaborando bebidas nutraceuticas, suplementos alimenticios con propiedades benéficas, sin embargo, la aplicación para la conservación de alimentos es de gran impacto para la industria de alimentos perecederos empleándolo como un agente inhibidor de microorganismos (Saucedo-Pompa, 2009), y su actividad antioxidante que incrementan la vida útil del alimento.

El ácido elágico puede estar presente en los llamados alimentos naturales como lo son algunos frutos como las nueces, las frutas de bayas como la frambuesa, la zarzamora, mora, el arándano entre otros algunos productos alimenticios (Kaponen, 2007). Por lo que el consumo de este tipo de alimentos en nuestros días cobra cada vez más importancia por los beneficios que brindan los componentes naturales que poseen, como el ácido elágico (Clifford y Scalbert 2000).

En vista de lo anterior, la presente investigación busca determinar el efecto de dos factores importantes en el proceso de producción de ácido elágico como son el pH y la temperatura de cultivo, cabe mencionar que es el

primer reporte sobre la producción de ácido elágico en cultivo en medio líquido usando extracto de cáscara de granada.

Con relación a la cáscara de granada se ha reportado que contiene un 85% de elagitaninos en la fracción polifenólica (Seeram y col., 2004), la cáscara de granada es un residuo agroindustrial de la industria procesadora de concentrado de jugos para la elaboración de bebidas refrescantes y alcohólicas a base de granada, este residuo es subutilizado, sin embargo, debido a la concentración de elagitaninos presentes en la cáscara representa un material de alto valor agregado, además, el Estado de Coahuila de Zaragoza es el quinto productor de granada a nivel nacional, según el SIACON en 2007.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general:

- Determinar el efecto del pH y la temperatura sobre la producción de ácido elágico por *Aspergillus niger* GH1, en cultivo en medio líquido usando extracto de cáscara de granada (*punica granatum*).

1.2.2 Objetivos específicos:

- Determinar la cantidad de ácido elágico presente en la cáscara de granada (*punica granatum*).
- Realizar un análisis proximal de los componentes de la cáscara de granada (*punica granatum*).
- Evaluar el efecto del pH sobre la producción de ácido elágico en cultivo en medio líquido usando extracto de cáscara de granada y la cepa de *Aspergillus niger* GH1.
- Evaluar el efecto de la temperatura sobre la producción de ácido elágico en cultivo en medio líquido usando extracto de cáscara de granada y la cepa de *Aspergillus niger* GH1.

1.3 Justificación

Se han realizado diferentes investigaciones sobre la producción de ácido elágico tanto en cultivo en medio sólido como en cultivo en medio líquido, sin embargo, los rendimientos comparados con los métodos químicos están por debajo de las expectativas de industriales, por lo tanto es necesario evaluar diferentes parámetros como el pH y la temperatura para iniciar la optimización del proceso biotecnológico para producción de ácido elágico.

El establecimiento de mejores condiciones de proceso impactará de forma positiva en el proceso de obtención de ácido elágico, beneficios que pueden ser en costos de producción, tiempo de producción y sobre todo el rendimiento final incrementando la producción de ácido elágico.

Otro factor de impacto es la utilización de un residuo agroindustrial, el cual se desecha y genera contaminación ambiental, al usarlo para la producción de ácido elágico dándole valor agregado a este subproducto, además que se contribuye con el medio ambiente.

El establecimiento de las condiciones de producción biotecnológica de ácido elágico representa un desarrollo científico y tecnológico importante para la industria y la sociedad, que a su vez, puede representar la generación de empleos para las diferentes localidades productoras de granada y generar el incremento de los cultivos de granado, proporcionando así un desarrollo sustentable de esta especie vegetal y la producción de ácido elágico.

1.4 Hipótesis

El pH y temperatura son factores determinantes en la producción de ácido elágico en cultivo en medio líquido.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de los taninos

Los taninos son definidos como compuestos polifenólicos, solubles en agua, de pesos moleculares que van de los 500 Da a los 20,000 Da (Khanbabaee y Van Ree, 2001), en la naturaleza se encuentran ampliamente distribuidos en plantas, frutos, hojas, tallos, corteza, raíces y tronco (Haslam, 1989). Este tipo de compuestos son considerados metabolitos secundarios de las plantas, debido a que no están involucrados en procesos del metabolismo primario (Bhat y col., 1998).

Dentro de la célula vegetal, los taninos se encuentran en las vacuolas (Carretero, 2000), la acumulación de este tipo de compuestos particularmente en hojas, corteza y tronco le confiere protección a las partes susceptibles de ser atacadas por virus, inactivación de enzimas secretadas por microorganismos y la resistencia a ser atacadas por insectos (White, 1957).

Además les confiere protección contra rumiantes debido a la capacidad de los taninos de interaccionar con las proteínas, esto provoca un sabor

astringente y desagradable para los animales, además de que las moléculas que son susceptibles a ser degradados por los microorganismos como polisacáridos y proteínas son altamente resistentes a la degradación después de unirse a los taninos (Goldstein y Swain, 1963).

Los taninos se encuentran abundantemente en nuestra dieta y existe evidencia de que juegan un papel muy importante en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer y enfermedades cardiovasculares por su actividad antioxidante (Manach, 2005). La actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos se debe principalmente a sus propiedades redox, que juegan un papel importante en la absorción y neutralización de radicales libres (Osawa, 2000).

2.2 Clasificación de los taninos

Existen diversas formas de clasificar a los taninos, la más empleada es la que los agrupa con base en su estructura química, algunos autores mencionan dos grandes grupos, los taninos hidrolizables (TH) y los taninos condensados (TC) (Seeram y col., 2005). Aunque otros manejan la clasificación en cuatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (Khanbabaee y Van Ree, 2000). En este documento se manejará esta última clasificación.

2.2.1 Galotaninos

Son ésteres de poligaloil glucosa (ácido gálico), compuestos que consisten de una molécula central de glucosa, la cual es rodeada por algunas unidades de ácido gálico, puede haber en su estructura catequinas o terpenoides. De la hidrólisis de los galotaninos se obtiene ácido gálico más azúcar (Mueller-Harvey, 2001). Deben ser por lo menos tres grupos galoilos en la molécula de glucosa para ser considerado tanino, el más común es la pentagaloil glucosa (PGG) (Aguilera-Carbó, 2009)

2.2.2 Taninos complejos

Son aquellos en los cuales los grupos de catequina están unidas por un enlace glicosídico a grupos de galotaninos o elagitaninos.

2.2.3 Taninos condensados

Son conocidos como proantocianidinas poliméricas, están compuestos de unidades flavonoides: Flavon-3-ol (catequina) y Flavon-3,4-diol (leucoantocianidinas) y no poseen residuos de azúcar (Belmares-Cerda y col., 2004). Forman complejos con lignina y otros componentes de la pared celular, además de que los oligómeros y polímeros de unidades de flavonoides, ligadas por enlaces carbono-carbono no son susceptibles a la formación de enlaces después de la hidrólisis (Garro y col., 1997).

2.2.4 Elagitaninos

Son taninos derivados del pentagalolil-glucosa por reacciones de oxidación entre las unidades de ácido gálico (Mueller-Harvey, 2001). Por hidrólisis se genera ácido hexahidroxifénico el cual espontáneamente se deshidrata a la forma lactona conocida como ácido elágico (Belmares-Cerda y col., 2004) y el glucósido correspondiente. La principal característica de los elagitaninos es el grupo hexahidroxidifenilo (HHDP). Existen más de 500 elagitaninos reportados en la literatura (Feldman y col 1999).

2.3 Importancia de los taninos

A través del tiempo las plantas con alto contenido de polifenoles han sido utilizadas para diferentes propósitos, los cuales incluyen la rama de la medicina, nutrición, saborizantes, fragancias entre otros (Edelmann, y col., 2002). Por esto la importancia de los taninos recae en aspectos muy importantes como los siguientes:

2.3.1 Importancia biológica

Los taninos funcionan como repelentes naturales contra predadores y microorganismos, que ayudan de esta manera a proteger a la planta, gracias a su propiedad para combinarse con proteínas y otros polímeros. Presentan un efecto tóxico contra patógenos potenciales en ciertos tejidos de la planta, produciendo resistencia al ataque de virus y microorganismos, polimerizándose

en forma de barrera protectora insoluble, previniendo a las plantas de ataques microbianos. Gracias a su propiedad astringente destruye los tejidos del paladar a través de la precipitación de proteínas salivales (Edelmann, y col., 2002). Limitan la disponibilidad de nutrientes para los animales, inhiben la acción de algunas enzimas y en general reducen la energía metabolizable (Méndez y col, 1984).

En frutos no maduros los taninos promueven la astringencia, pero al madurar se polimerizan y se elimina el sabor astringente, es decir, un mecanismo de defensa contra insectos nocivos (Olivares, 1983).

2.3.2 Importancia industrial

Por sus propiedades intrínsecas los taninos se utilizan como tintes (café, amarillo y rojo), en la fabricación de pegamentos, para controlar los lodos en los pozos de perforación petrolera y principalmente para curtir pieles de animales (FAO, 1953). En la industria farmacéutica, se utilizan para la producción de antioxidantes de gran interés, como lo es el ácido gálico y el ácido elágico.

2.3 Fuentes de obtención de taninos

La principal fuente de obtención de taninos radica en el reino vegetal ya que estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, principalmente en las hojas, tallos, raíces, cortezas, ramas y frutos de plantas (Khanbabaee y Van Ree, 2001). En el siguiente cuadro (1) se

muestra el porcentaje de distribución de los taninos en algunas familias del reino vegetal (Swain, 1979).

Cuadro 1. Distribución de los taninos en el reino vegetal.		
Grupo	% taninos condensados.	%taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos)
<i>Psilopsida</i>	0	0
<i>Lycopsida</i>	0	0
<i>Sphenopsida</i>	28	0
<i>Helechos</i>	92	0
<i>Angiospermas</i>	54	13
<i>Dicotiledoneae</i>	62	18
<i>Monocotiledoneae</i>	29	0
Fuente: Swain, 1979.		

Varias familias de plantas tienen capacidad para sintetizar diferentes tipos de taninos, aunque una planta específica puede especializarse en una forma particular, por ejemplo, *Ericaceae.-Calluna sp. Erica sp y Rhodendron sp* son ricas en proantocianidinas. *Aceraceae.-* tiene bajo nivel de proantocianidinas combinado con diferentes patrones de taninos hidrolizables. *Artostsphylos.-uva-ursi.-* tienen mínima capacidad para síntesis de proantocianidinas que combina con un alto nivel de metabolismo (Swain, 1979).

La cantidad de taninos puede variar en las distintas porciones de la planta, por ejemplo, *Rhus coriaria* 27% en hojas, 6% en corteza y 4% en la madera. *Schinopsis lorentell* 70% en la madera, 7% en la corteza y 2.5% en la savia (Haslam, 1966).

En algunas plantas se producen abundantes taninos en los follajes, en semillas en germinación, yemas en crecimiento y durante el desarrollo del fruto, correspondiendo todo ello a sitios de intenso metabolismo. En otras plantas la

abundancia de taninos se presenta en la corteza y madera de dicotiledóneas, y en este caso la mayor concentración aparece en células muertas o viejas (probablemente aquí exista una íntima relación en la biosíntesis de la lignina y de otros compuestos del grupo de los flavonoides como lo son los taninos) (Haslam, 1966).

La extracción de taninos a partir de hojas y frutos nos proporcionan taninos hidrolizables, mientras que las cortezas y maderas nos proveen taninos condensados (Olivares, 1983).

2.5 Fuentes de obtención de elagitaninos y ácido elágico

La principal fuente de obtención de elagitaninos y ácido elágico es la vegetal, principalmente en las hojas, ramas, raíces, tallos, frutos y cortezas, como por ejemplo el roble y el castaño (Lei, 2001). Se sabe también que los árboles arbustivos o árboles de bayas son también una fuente importante de elagitaninos y ácido elágico, como por ejemplo, el arándano, la frambuesa y la granada (Clifford y Scalbert, 2000. Vattem y Shetty, 2003. Seeram, 2005). En el siguiente cuadro (2), se presentan algunas de las principales fuentes de obtención de elagitaninos y ácido elágico.

Cuadro 2. Fuentes vegetales de elagitaninos y ácido elágico.		
Nombre científico	Nombre común	Ácido elágico (mgg ⁻¹)
<i>Quercus robur</i> y <i>alba</i>	Roble	19.0-63.0
<i>Juglans regia</i>	Nuez americana	28.9
<i>Castanea sativa</i>	Castaña	89.0
<i>Fragaria ananassa</i>	Fresa	0.4-0.6
<i>Rubus idaeus</i>	Arándano	1.2-1.5
<i>Rubus occidentalis</i>	Zarzamora	1.5-2.0
<i>Bertholletia excelsa</i>	Nuez de Brasil	0.59
<i>Carya illinoensis</i>	Nuez común	0.33
<i>Punica granatum</i>	Granada	0.78
Fuentes: Bianco y col; 1998., Clifford y Scalbert, 2000 y		

El contenido de elagitaninos se mide con base a la cantidad de ácido elágico presente, después de una hidrólisis. Puesto que las plantas contienen cierta concentración de ácido elágico libre, de forma natural, este debe ser medido antes y después de la hidrólisis de modo que para obtener la cantidad real de elagitaninos presentes se resta el ácido elágico liberado (inicial) al ácido elágico total (final) presente en la planta. Se debe tener en cuenta que ciertos procesos alimenticios pueden liberar ácido elágico (Clifford y Scalbert, 2000).

Las fresas, zarzamoras y frambuesas son mayormente responsables de la ingesta de elagitaninos en la dieta estadounidense. En la pulpa de las fresas se reporta un contenido total de ácido elágico de $0.4-0.6 \text{ mgg}^{-1}$ de fruta en peso seco, de los elagitaninos presentes en las fresas se ha identificado solamente a casuarictin.

En frambuesas y zarzamoras el contenido total de ácido elágico llega a $1.2-1.5$ y $1.5-2.0 \text{ mgg}^{-1}$ de fruta en peso seco respectivamente del cual el 88% está contenido en las semillas. Por otro lado en el jugo de frambuesa se encontraron 68 mg de ácido elágico por litro de producto. El elagitanino mayoritario en estas muestras corresponde a sanguin. H-6, además se encontraron los elagitaninos casuarictin, pontentillin y pedunculagin (Daniel y col., 1989).

Tanto en la pulpa como en la cáscara del mango se encuentra un total de 30-160 mg de taninos por fruta, de los cuales la mayoría son galotaninos y algunos elagitaninos que no han sido bien reportados (Subranianyam y col., 1979).

Se identificó también ácido elágico en nueces como la avellana y nuez pecanera, 0.59 y 0.33 mgg^{-1} en peso seco respectivamente (Daniel y col., 1989). En especias como el clavo se ha encontrado la presencia de eugenin, elagitanino que ha sido aislado y completamente caracterizado (Nonaka y col., 1980). El té es particularmente rico en flavonoides pero contiene elagitaninos como el 1-O-galoil-4,6-(S)-hexahidroxidifenil- β -D-glucosa el cual ha sido reportado tanto en el té de hojas frescas así como en el té procesado (Nonaka y col., 1984).

Los elagitaninos pueden estar presentes en bebidas de las frutas que los contienen, dependiendo del tratamiento al cual se someten. En el jugo y vino de la uva muscadina el contenido de ácido elágico llega a 30 mgL⁻¹ pudiendo alcanzar hasta los 55 mgL⁻¹ a través del periodo de añejamiento. Este contenido varía de acuerdo al método de procesamiento y la variedad e la fruta (Lin y Vine, 1990; Auw y col., 1996). Sanguiin H-6 pedunculagin y otros dos elagitaninos que aun no han sido identificados, fueron encontrados en las hojas de un árbol de nuez del género *Juglans* (Jin y col., 1998).

Se han encontrado elagitaninos en cáscaras, hojas y corteza de la granada, de los cuales se desconoce su presencia en la porción comestible de la planta, hasta el momento. Se han realizado análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en ingles) al extracto de polifenoles totales de cascara de granada, (*Punica granatum*) (PTP). Los resultados muestran a punicalagin como el componente mayoritario el cual esta presente en una 80-85% (p/p), además encontraron acido elágico (1.3% p/p) y cantidades no cuantificadas de punicalin y glucósidos de acido elágico (Seeram y col., 2005).

En el 2007 Ascacion-Valdes cuantificó el contenido de ácido elágico en cascara de granada. Detectó concentraciones de 501.9 mg para la cáscara de granada en estadio intermedio y 531.5 mg para la cáscara de granada en estadio verde por gramo de material vegetal seco. Para estas determinaciones utilizó la técnica de metanolisis realizada a 80 °C, empleando ácido clorhídrico metanólico y una mezcla de ácido sulfúrico y metanol para llevar a cabo la hidrólisis del material, respectivamente.

En el siguiente cuadro (3) se muestran algunas fuentes de obtención de elagitaninos.

Cuadro 3. Otras fuentes potenciales de obtención de elagitaninos.	
Material vegetal.	Nombre común
<i>Pistacio vera</i>	Pistache

<i>Mangifera indica</i>	Mango
<i>Corylus avellana</i>	Avellana
<i>Psidium guava</i>	Guayaba
<i>Pimenta officinalis</i>	Pimiento
<i>Prunus pérsica</i>	Durazno
<i>Camelia sinensis</i>	Manzanilla
<i>Vitis vinífera</i>	Uva
<i>Ribes grosularia</i>	Grosella
Fuente: Clifford y Scalbert, 2000.	

2.6 Biosíntesis de elagitaninos y ácido elágico

Los taninos hidrolizables son tradicionalmente divididos en galotaninos y elagitaninos. Es generalmente aceptado que ambos grupos se derivan de un precursor en común 1,2,3,4,5,6-penta-O-galoil- β -D-glucopiranososa (penta galoil glucosa, PPG), por formación oxidativa de uno o varios enlaces difenilo entre dos o más residuos galoilo (Haslam, 1989). Niemetz y Gross en 2003 mencionan que el acoplamiento oxidativo lo lleva acabo una enzima lacasa (EC 1.10.3.2) de la familia de las fenol oxidasas, para formar el enlace C-C entre los galoilos de la PPG dando lugar al grupo HHDP de los elagitaninos.

La primer prueba experimental fue presentada por Niemetz (2000), quien reporto que extractos libres de células de *Tellina grandiflora*, una planta herbácea perenne que crece y florece en primavera, fueron capaces de oxidar a la PGG formando elagitaninos monoméricos.

2.6.1 Elagitaninos

La característica de los elagitaninos son las unidades HHDP que se acoplan en las posiciones 4-6 o la posición 2-3 de la unidad D-glucopiranososa, y tienen la conformación (*S*), mientras que el acoplamiento en las posiciones 3-6 conduce únicamente a la formación (*R*) de las unidades HHDP (Figura 1). Los acoplamientos en 1-6 son raros en la naturaleza (Lei, 2002).

Los elagitaninos se pueden clasificar de acuerdo al número de grupos HHDP en la molécula debido a que, los monómeros de elagitaninos pueden ser oxidados en las plantas y formar dímeros, trímeros y tetrameros, oligómeros y polímeros, con pesos moleculares de 4000 a 20000 Da (Carretero, 2000; Khanbabaee y Van Ree, 2001).

Cuando los elagitaninos son expuestos a ácido o bases, los enlaces éster son hidrolizados y el grupo HHDP se libera, para tener estabilidad la molécula se lactoniza de manera espontánea, para formar al ácido elágico.

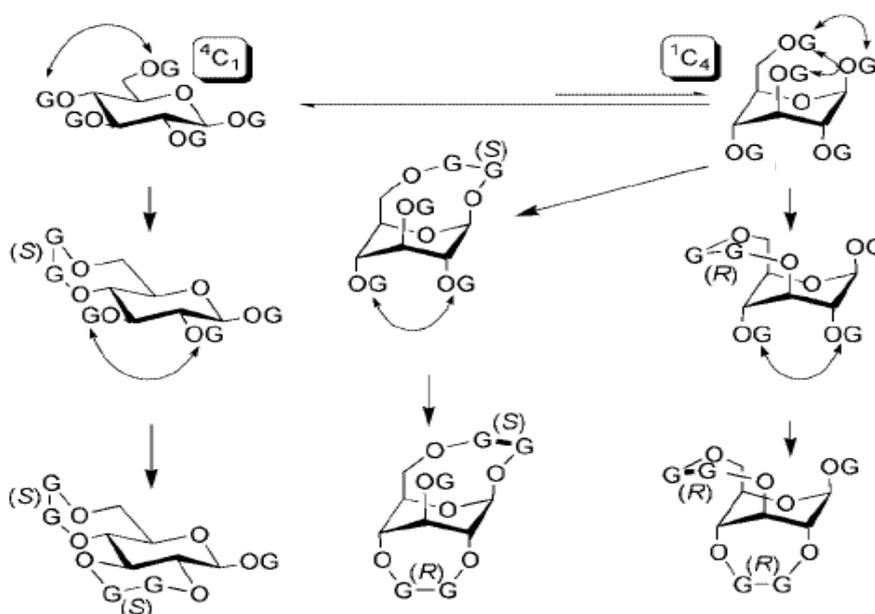


Figura 1. Algunos posibles acoplamientos de la D-glucopiranososa en 1C_4 o 4C_1 con la conformación de unidades HHDP en (S)- o (R)-.(Khanbabaee y Van Ree, 2001).

2.6.2 Ácido elágico

El ácido elágico por su nomenclatura IUPAC 2,3,7,8-tetrahidroxichromeno[5,4,3-cde]chromeno-5,10-diona. Es una molécula termodinámicamente estable, su punto de fusión es de 362° C, tiene un peso

molecular de 302.2 g/mol, además es insoluble en agua y ligeramente soluble en solventes orgánicos, esta propiedad se debe a que el anillo aromático le confiere propiedades lipofílicas y los 4 grupos hidroxilo y las dos lactonas le confieren propiedades hidrofílicas, ya que funcionan con aceptores de electrones y formando puentes de hidrogeno ver en la figura 2 (Bala, y col., 2005).

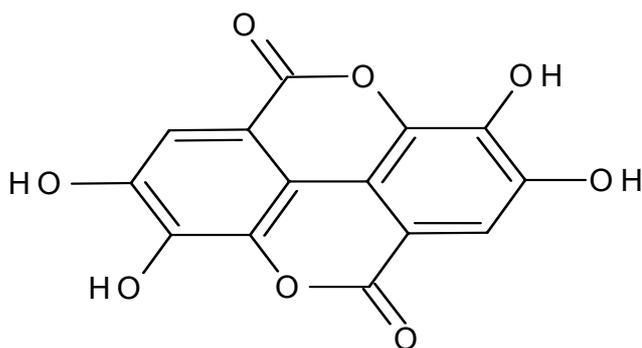


Figura 2. Estructura del ácido elágico.

Los elagitaninos y ácido elágico han sido empleados de manera artesanal o medicina rural, para aliviar enfermedades, gastrointestinales, úlceras gástricas, quemaduras, infecciones bucales al ser ingeridos en infusiones de plantas que los contienen, esto generó que los investigadores desarrollaran técnicas de aislamiento y caracterización de los principios activos de las mismas, descubriendo que los elagitaninos y el ácido elágico son los responsables de estos beneficios en la salud. Su alta actividad antioxidante los llevó a ser considerados moléculas que pueden prevenir o disminuir enfermedades degenerativas como el cáncer (Ito y col. 1999; Clifford y Scalbert, 2000; Seeram y col. 2005), así como inhibir la replicación de los virus, tales como el virus de inmunodeficiencia humana y el del papiloma humano (HIV y HPV por sus siglas en inglés) (Ruibal, 2003).

2.7 Propiedades del ácido elágico

La propiedad astringente de los elagitaninos y el ácido elágico los ha identificado como ingredientes útiles en la medicina tradicional, así como también en la preparación de alimentos, maduración de frutas, preparación de

bebidas como el té (Carretero, 2000) y el vino tinto a los que les da su propiedad astringente y color y aroma característicos (Dousot, y col., 2000).

2.7.1 Propiedades industriales

Dentro de la industria de bebidas los elagitaninos y el ácido elágico, se emplean para la clarificación de las bebidas, precipitando sustancias que forman coloides como, carbohidratos de alto peso molecular y proteínas, sobre todo en la industria cervecera. Otra aplicación es la fabricación de cremas y lociones aclaradoras de piel, el poder antioxidante del ácido elágico empleado como elagatos para disminuir la generación de melanina. Otra importante aplicación se desarrolla en la industria de tratamiento de aguas residuales en donde se emplea para la precipitación de metales y la reducción de los mismos en el agua tratada (cuadro 4).

Aplicación	Referencia
Color y sabor en bebidas destiladas y fermentadas.	Dousot, y col. 2000; Lee y col, 2002
Precipitación de metales.	Przewloka y Shearer, 2002.
Crema para aclarar la piel.	Patente española, 1998.

Además de las anteriores aplicaciones, el ácido elágico ha sido empleado recientemente para la elaboración de recubrimientos combinado entre la matriz de cera de candelilla, obteniendo resultados muy interesantes sobre el incremento de vida de anaquel de frutas a temperatura ambiente y en refrigeración a escala laboratorio. (Saucedo-Pompa, y col. 2009)

2.7.2 Aplicaciones médicas

El ácido elálgico ha ganado gran relevancia desde finales de la década del siglo pasado hasta la fecha, debido a su actividad biológica, como se ha mencionado a la largo del texto la capacidad de los taninos y sobre todo del ácido elálgico de reaccionar con otras moléculas le confieren poder antioxidante (Ani, 2006,). A continuación se hace referencia a las actividades en las cuales actúa el ácido elálgico

2.7.3 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar, inhibir o prevenir la oxidación de compuestos oxidables, atrapando radicales libres y disminuyendo el estrés oxidativo (Ani, 2006). El mecanismo del AE, en particular, es muy complicado ya que interactúa en diversos mecanismos.

Experimentos in-vivo indican que el AE posee gran actividad contra especies fisiológicas reactivas ($\text{ROO}\cdot$, $\text{OH}\cdot$, Cu^{2+} y $\text{O}_2\cdot^-$), por lo tanto representa una forma natural de eliminar radicales del cuerpo humano (Gamal-Eldeen, 2001).

Jugos comerciales de granada muestran una actividad antioxidante tres veces mayor que el vino tinto. El principal compuesto antioxidante en el jugo de granada son taninos hidrolizables, pero antocianidinas y derivados del AE contenidos en el jugo contribuyen a la capacidad antioxidante total (Gil y col., 2000).

Por su parte, el cognac exhibe propiedades antioxidantes relacionadas con compuestos no flavonoides, en particular elagitaninos y ácido elálgico, los cuales son extraídos de las barricas durante el primer año de añejamiento (Da Porto y col., 2000).

2.7.4 Actividad anti-lipoxidación o disminución de LDL

La propiedad antioxidante previene la formación de colesterol malo denominado LDL (por sus siglas en ingles low density lipoproteins). Se han realizado estudios sobre esta propiedad, evaluaron los polifenoles totales de nuez en donde demostraron que el ácido elálgico en sinergismo con otros

polifenoles reducen los niveles de LDL (Anderson y col. 2001), previniendo riesgos de problemas cardiacos y obstrucción de venas.

2.7.5 Actividad anti-mutagénica y anti-carcinogénica

La reacción coordinada entre el ácido elágico y un típico carcinogénico benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epoxido (BPDE), prueba al ácido elágico como un agente quimioprotector contra cánceres causados por aromáticos policíclicos (PAHs) (Huentz, P. y col. 2005), inhibiendo la mutación de células sanas.

El ácido elágico redujo la multiplicidad de tumores en colon de ratón y la incidencia de carcinoma en vejiga de ratón, cuando fue administrado vía oral en la dieta (Kelloff, G. y col. 1994). El ácido elágico es conocido por su acción de modular la activación de carcinogénesis por medio de la inhibición de las enzimas de la fase 1 del citocromo P450 e induce las enzimas de la fase 2 que están involucradas en la detoxificación carcinogénica. El ácido elágico a concentraciones entre 1-100 $\mu\text{M/L}$, mostró una fuerte actividad anti-proliferativa contra células cancerígenas de colon, pulmón y próstata (Loss, J. y col. 2004).

Se han reportado investigaciones sobre la inhibición de la proliferación de células malignas de cáncer de piel (melanoma), cáncer de mama, de estomago, esófago, hígado y otros (Ito y col. 1999; Clidford y Scalbert, 2000; Seeram y col. 2005;)

2.7.6 Actividad anti-microbiana

El ácido elágico ha probado ser un potente antimicrobiano, se han realizado trabajos experimentales contra patógenos como *Staphilococcus aureus* en donde no permitió la coagulación del plasma en las cajas de Petri en un tiempo de incubación de 24 a 37°C, inhibiendo el crecimiento del microorganismo (Akiyama, y col. 2001). En otro estudio los precursores del ácido elágico (Punicalagina), obtenidos de cáscara de granada (*Punica granatum* L.), mostraron actividad antibacterial contra 18 cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (por sus siglas en ingles MRSA), con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 61.5 $\mu\text{g/mL}^{-1}$. (Machado y col, 2002).

2.7.7 Actividad antiviral

El ácido elágico y los elagitaninos son estudiados ampliamente por su capacidad de inhibir la replicación del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH), de la planta *Phyllanthus amarus* fueron extraídos y purificados dos elagitaninos, la geranina y la corilagina, estas moléculas fueron capaces de bloquear la interacción de la glucoproteína 120 del VIH-1, en concentraciones inhibitorias de 2.65 a 0.48 $\mu\text{g/mL}$ (extracto agua/alcohol) receptor celular primario CD4 al 50%. La inhibición fue más evidente para la enzima integrasa del VIH-1 (0.48-0.16 $\mu\text{g/mL}$), la reversa transcriptasa (8.17- 2.53 $\mu\text{g/mL}$) y proteasa (21.80-6.28 $\mu\text{g/mL}$) valores para geranina y corilagina respectivamente. Esta investigación fue llevada a cabo *in vitro* e *in vivo*, con voluntarios, la administración fue oral y la potente actividad anti-VIH en sangre fue demostrada, obteniendo una reducción del 5% al 30% de la replicación del VIH. Este estudio soporta la conclusión de que los elagitaninos tienen un efecto inhibitorio sobre el VIH no solo *in vitro* sino *in vivo* también. (Notka y col. 2004) Y disminuye la propagación del virus VIH en el cuerpo de personas infectadas (Ruibal, 2003).

2.7.8 Actividad gastroprotectiva

La activación de células pancreáticas es el primer paso en el desarrollo de la fibrosis pancreática, el AE ha demostrado inhibir esta activación (Masamune y col., 2005). El efecto gastroprotectivo de los extractos de *Quercus suber* y *Quercus coccifera* y algunos taninos como pedunculagin, castalagin, phillyraeoidin A y acutissimin B, purificados de los extractos, fueron probados en ratones usando el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol. Ambos extractos probaron la formación de las úlceras, lo mismo sucede con los taninos purificados utilizados, dentro de los cuales destaca el elagitanino castalagin como el más potente (Khennouf y col., 2003).

2.7.9 Reducción de los niveles de glucosa

Algunos precursores del ácido elágico (*lagerstroemina*, *flosina* B y *reginina* A) fueron aislados de una planta filipina (*Lagerstroemia speciosa*),

empleada por los nativos para controlar la diabetes mellitus, estos compuestos aislados incrementaron el transporte de glucosa en adipositos de rata pudiendo reducir los niveles de glucosa en la sangre, sin embargo, es necesario el estudio detallado de este fenómeno debido a que no esta dilucidado el mecanismo de estimulación del transporte de glucosa por estas moléculas (Hayashi y col. 2002).

2.8 Biodegradación de elagitaninos

Existen estudios que hablan sobre la biodegradación de elagitaninos, la mayoría de ellos se refiere a un conjunto de moléculas que puede ser degradadas por enzimas producidas por hongos, entre estas moléculas degradadas se incluye a los elagitaninos. En cuanto a biodegradación de elagitaninos como tal, los investigadores han atribuido el poder hidrolítico a varias enzimas.

Yoshida y colaboradores trabajaron en 1999 con extractos de hojas de *Tibouchina multiflora*, una planta rica en taninos, dilucidando a dos taninos oligoméricos a los cuales nombraron nobotnanin O Y P. El primero corresponde a un polvo blanco amorfo y el segundo de color ligeramente café. Sometieron a estos dos compuestos a una hidrólisis enzimática utilizando la enzima tanasa sintetizada por *Aspergillus niger* y monitorearon el curso de la reacción por HPLC. Observaron la formación de ácido gálico y otros compuestos conforme a la desaparición del material inicial. Entendiéndose así que la tanasa solo fue capaz de hidrolizar los enlaces de los grupos galoil y no de los grupos HHDP, por lo tanto solo se observa la formación del ácido gálico y no de ácido elágico, producto común resultante de la hidrólisis de elagitaninos.

En la industria del arándano, al procesar su jugo se crea en gran cantidad de pomaza como residuo, en el 2003 Vatterm y Shetty bio-procesaron este residuo mediante una fermentación en medio sólido usando un hongo grado alimenticio, *Lentinus edodes*. Entre sus resultados reportan que durante el curso de la fermentación se detecto un incremento de el contenido fenólico así como en la actividad antioxidante, estos aumentos los correlacionaron con el incremento en la actividad β -glucosidasa ya que observaron un comportamiento similar en los picos, lo cual condujo a los investigadores a

atribuir una posible intervención de la enzima β -glucosidasa sobre la liberación de los fenoles de la pomaza de arándano.

Hasta ese momento no existían reportes de una enzima, nueva o específica, responsable de la hidrólisis de elagitaninos en particular. Fue más tarde en ese mismo año que el grupo de investigadores dirigidos por el Dr. Huang, reportaron a la enzima valonea-tanin-hidrolasa, producida por *Aspergillus niger* SHL, como la enzima responsable de hidrolizar específicamente los enlaces ésteres presentes en la valonia, un elagitanino extraído del roble. Cabe mencionar que en su estudio esencialmente, se midió la actividad tanasa como tal, por lo tanto no se le puede atribuir a esta nueva enzima el poder hidrolítico específico sobre elagitaninos (Huang y col., 2005).

Shi y colaboradores en el (2005) también trabajaron sobre la biodegradación de elagitaninos usando a la valonia. Evaluaron los extractos fermentados de los microorganismos *Aspergillus niger* y *Candida utilis*. Atribuyeron la acumulación de ácido elágico a la habilidad degradadora de taninos de valonia por la tanasa de *Aspergillus niger* y tanto a tanasa como a polifenoloxidasas en el caso de *Candida utilis*, una vez más, los autores solo correlacionaron las señales de acumulación de ácido elágico contra actividad tanasa, en las cuales se observó un comportamiento similar, siendo esto base insuficiente para atribuir este poder degradante a tanasa o a polifenoloxidasas. Incluso los autores remarcaron la necesidad de estudios posteriores enfocados a las rutas de biodegradación, pues nada estaba dicho aún.

El terreno de la biodegradación de elagitaninos era aún desconocido, muchas deducciones habían sido hechas y la más importante era que estas moléculas eran degradadas por una enzima diferente a la tanasa y diferente a la polifenoloxidasas. Saavedra y colaboradores (2005) expresaron la importancia de invertir sobre esta línea, debido a que los beneficios redituarian en bio-procesos mejorados para la obtención de ácido elágico, ya que los presentes al momento no eran adecuados por su alto costo y bajo rendimiento.

La investigación llevada a cabo por Lee y Talcott en el 2004, evaluó el efecto de la β -glucosidasa y la tanasa sobre un extracto correspondiente a elagitaninos de uva muscadina. En cuanto a la β -glucosidasa encontraron que esta era capaz de mediar la liberación del ácido elágico presente en los elagitaninos, en cambio la tanasa solo mediaba la liberación de ácido gálico presente, por lo que solo hidrolizaba parcialmente a estas moléculas. Concluyendo así que la tanasa no era la enzima responsable de la hidrólisis de elagitaninos para producir ácido elágico pero tampoco se le atribuyó este poder a la β -glucosidasa

El trabajo publicado por Aguilera-Carbó y colaboradores (2007), reporta la producción de ácido elágico mediante un cultivo en medio sólido usando espuma de poliuretano (PUF) como soporte y un extracto acuoso de cáscara de granada (*punica granatum*) como única fuente de carbono y energía. En este estudio los autores reportaron a *Aspergillus niger* GH1 como un microorganismo capaz de consumir elagitaninos y producir ácido elágico. Los autores atribuyeron esta biodegradación a una nueva tanasa, distinta a una tanin-acil-hidrolasa. Además, evidenciaron la factibilidad de producir, biotecnológicamente, ácido elágico.

Más tarde Huang (2007), evaluó como afectan ciertos parámetros a lo que llamó actividad elagitanin-acil-hidrolasa, así nuevamente atribuye la hidrólisis de elagitaninos a una nueva enzima a la cual le asignó ese nombre. Sin embargo el extracto enzimático usado no fue sometido a un protocolo de purificación y tampoco aislaron la proteína responsable de esta actividad hidrolítica, por lo cual la existencia de una elagitanin-acil-hidrolasa no era hasta el momento concluyente.

Hernández-Rivera (2008), sometió un extracto enzimático purificado producido por *Aspergillus niger* GH1 en cultivo en medio sólido a electroforesis en geles de poliacrilamida, de esta manera logró evidenciar la existencia de una banda de alrededor de los 200 Kilodaltones (KDa), potencialmente responsable de la hidrólisis del grupo HHDP de elagitaninos.

Es aún necesario un estudio para confirmar las diferencias entre taninacil-hidrolasa para demostrar las diferencias catalíticas entre ambas enzimas y entender los procesos de biodegradación de galotaninos y elagitaninos (Aguilera-Carbó y col., 2008).

2.9 Procesos de extracción de elagitaninos

Los métodos usados en la extracción de elagitaninos deben ser planeados tomando en cuenta que los pasos utilizados en la extracción pueden afectar dichos resultados. El solvente y el método de homogenización afectan tanto a la recuperación y a la extracción. Los elagitaninos pueden ser extraídos de muestras de plantas frescas, congeladas, secas o liofilizadas (Hagerman, 2002). Básicamente la extracción de elagitaninos se lleva a cabo con procesos en los cuales se involucran distintos solventes polares como el etanol, metanol, la acetona, entre otros, y el agua, todo esto en diferentes proporciones. En algunos casos se utiliza también la adición de ácidos a algunos de los solventes mencionados para llevar a cabo la extracción de estas sustancias. Generalmente se emplean estas sustancias en la extracción de elagitaninos aprovechando sus características químicas, como la polaridad que poseen entre otras. En la siguiente tabla se muestran algunas de las sustancias empleadas en la extracción de elagitaninos.

Cuadro 5. Sustancias para la extracción de elagitaninos.	
Sustancias empleadas en la extracción.	Referencia.
Agua a régimen de contracorriente.	Ruibal, 2003.
Agua (30%) y acetona (70%).	Terril y col. 1994.
Agua (20%) y etanol (80%).	El-Toumy, 2002.
Acetato de etilo.	Maata y col. 2004.
Agua (25%) y metanol (75%)	Hakkinen, 2000.
Agua y metanol (proporción 1:1).	Cadahía, 2001.
Agua (30%) y metanol (70%).	Bianco y col. 1998.
Metanol (50%).	Mueller-Harvey, 2001.
Metanol y ácido clorhídrico (0.1%).	Mullen, 2002

2.10 Sistemas de Cultivo

Existen diferentes sistemas de cultivo para la producción de metabolitos secundarios entre otros, como enzimas, ácidos orgánicos etc. Los principales sistemas empleados se describen a continuación.

2.10.1 Cultivo en medio Líquido (FL)

En el cultivo líquido (CL) o fermentación sumergida (FSm) ocurre en un medio homogéneo, que facilita el control de la fermentación. Además, los productos metabólicos y el calor se dispersan fácilmente, por lo que, no son un factor limitante para el crecimiento del microorganismo. La barrera principal de transferencia de O₂ en la FL, es su baja solubilidad en el agua y, al hacerse mayor la capa de agua que debe cruzar aumenta la dificultad para que llegue a la célula. Gran parte del gasto energético que debe realizarse en la FL está relacionado con la necesidad de satisfacer la demanda de oxígeno en el crecimiento de los microorganismos. Esto es muy claro en el caso de *Aspergillus niger*, que es un organismo aeróbico estricto y necesita una alta tasa de transferencia de oxígeno para mantener su crecimiento y producir muchos de los metabolitos de interés (Righelato, 1975, Solomon y col, 1975).

El tipo de recipiente usado y el tipo de agitación dependen de la naturaleza de la fermentación que se esté investigando. Los cultivos agitados usualmente son aplicados a procesos aerobios los cuales tienden a ser de dos tipos:

- 1.- Aquellos en los cuales se necesita una gran cantidad de oxígeno para producir una gran cantidad de células, esto es común en el caso de organismos filamentosos.
- 2.- Aquellos en los cuales las condiciones de aerobiosis son requeridas pero la cantidad de oxígeno necesitada es mucho menor, esto ocurre frecuentemente con las bacterias.

Para el primer tipo, pequeños volúmenes dan buenas tasas de transferencia de oxígeno, para el segundo tipo, volúmenes mayores de medio pueden ser usados con una tasa menor de agitación (Aguilar, 1998).

2.10.2 Cultivo en estado sólido (FS)

Hesseltine (1972) empleo el término de fermentación en estado sólido a todas las fermentaciones donde el sustrato no es líquido. Posteriormente, Raimbault (1980) propuso un término más preciso: "Las fermentaciones en las cuales el sustrato no está ni disuelto ni en suspensión en un gran volumen de agua". No obstante, Moo-Young y col. (1983), propusieron un término a todos los procesos que utilizan materiales insolubles en agua para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre; autores como Mudgett (1986) y Durand y col. (1988), han planteado una definición más general: "Es un método de cultivo de microorganismos sobre y/o dentro de partículas sólidas". El líquido ligado a las partículas sólidas debe estar en una cantidad que asegure la actividad del agua adecuada para el crecimiento y el metabolismo de los microorganismos, pero sin exceder el máximo poder de retención de este líquido en la matriz sólida.

La definición más general y reciente fue formulada por Viniegra-González (2002), donde se plantea que "es un proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos que tienen la propiedad de absorber y contener agua, con o sin nutrientes solubles". Esta definición abarca a procesos donde el soporte sólido es inerte y los sustratos que utiliza el microorganismo pueden ser sustancias solubles en agua, como el proceso de bioconversión de etanol y el crecimiento de *Candida utilis* sobre amberlita (Christen y col., 1993).

2.11 Efectos de la temperatura

La temperatura afecta al crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie dada sólo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas. Los psicrófilos presentan un rango de 5° a 15 °C, los mesófilos de 25° a 40 °C y los termófilos de 45° a 60 °C pero se han reportado de hasta 90 °C. Los organismos termófilos tienen un gran potencial de utilización pues la alta temperatura permite una mejor transferencia de calor, velocidades de reacción mayores y menor posibilidad de contaminación. La mayor parte de los microorganismos que se usan actualmente pertenecen al grupo de los mesófilos. (Quintero Ramírez, 1990).

2.12 Efectos del pH

El pH, medida de concentraciones de iones hidrógeno, tiene también un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y en el rendimiento. El pH para una especie presenta generalmente un máximo denominado pH óptimo. En bacterias el pH óptimo varía entre 6.0 y 8.0; en levaduras entre 4.0 y 6.0 y en mohos entre 3.0 y 7.0. Un cambio en el valor del pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último puede afectar la floculación de la biomasa (Quintero Ramírez, 1990).

2.13 Métodos de cuantificación de ácido elálgico

Existen diferentes metodologías para la cuantificación de ácido elálgico, las cuales se basan desde la formación de compuestos coloridos, pasando por la capacidad de absorción de los mismos a diferentes longitudes de onda, señales características de sus grupos funcionales, tipos de carbonos e hidrógenos de la molécula y finalmente por su masa molecular y los pesos de sus fragmentos.

A continuación se describen algunas técnicas para la cuantificación de ácido elálgico.

2.13.1 Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación e identificación de componentes polifenólicos ha despertado un gran interés por su importancia, lo que ha hecho que cada día sean más los datos que se pueden encontrar en la bibliografía científica sobre el perfil fenólico de vegetales. Además, la gran diversidad de compuestos fenólicos dispersos en los tejidos vegetales, así como sus diferentes estructuras químicas, ha traído consigo la necesidad de desarrollar un gran número de técnicas analíticas para su identificación y cuantificación. Las primeras técnicas desarrolladas fueron técnicas espectrofotométricas, que si bien tienen interés desde el punto de vista del control de calidad, no aportan la suficiente información desde un punto de vista nutricional, por lo que ha sido necesario recurrir a técnicas más precisas, como las cromatográficas, que

permitan la identificación individualizada de cada uno de los polifenoles de interés nutricional.

2.13.2 Técnicas espectrofotométricas

Existen diferentes métodos espectrofotométricos que han sido desarrollados para la determinación de ácido elágico en materiales vegetales. Dichos métodos registran la presencia del ácido elágico mediante la reacción que se lleva a cabo entre las sustancias empleadas en el método y el ácido elágico, en donde los carbonos menos sustituidos de la molécula son susceptibles al ataque nucleofílico. Cuando dicha reacción se lleva a cabo se forma un cromóforo que puede ser registrado mediante un espectrofotómetro. Se pueden mencionar métodos como el de Wilson y Hagerman (1990) en el cual se emplea nitrito de sodio.

2.13.3 Técnicas cromatográficas

Los métodos mas empleados para la cuantificación de ácido elágico son los cromatográficos dentro de los cuales podemos mencionar la cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución.

La cromatografía en capa fina es una prueba que más bien puede emplearse para comprobar la presencia de los compuestos que se pretendan evaluar, es decir, que se puede emplear como una prueba cualitativa para determinar la presencia del ácido elágico empleando diferentes fases móviles (Lei, 2001).

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica más empleada en la cuantificación de ácido elágico (Scalbert 1990, Bianco 1998, Hakkinen 2000). La importancia de ésta técnica radica en la definición de las condiciones que se usarán para la separación de los compuestos, condiciones como la definición de las fases móviles a emplear o si se usarán condiciones de gradientes o isocráticas etc. Es por esto que en los distintos trabajos reportados en donde se empleó ésta técnica no se establecen condiciones exactas para la cuantificación de ácido elágico.

Actualmente, la utilización de HPLC con detección por photo diodo array y acoplado a un detector de masa se ha empleado para la cuantificación de

flavonoles, flavonas y flavononas en alimentos. En esta técnica, las áreas del pico de cada uno de los compuestos a investigar se emplean para la cuantificación, mientras que el detector de masas se utiliza para incrementar la especificidad del método.

2.14 Generalidades del material vegetal empleado

En la presente investigación se empleo como material vegetal la granada (*Punica granatum*), la cual se hace una breve reseña.

2.14.1 Granada (*Punica granatum*)

El granado es uno de los frutales más antiguos cultivados en la península ibérica. Es un árbol pequeño perteneciente a la familia de las Punicáceas cuyo pericarpio es de color amarillo rojizo, de pulpa ácida y una gran cantidad de semillas (Favadi, 2005). Es bien conocido que posee actividades farmacológicas como antimicrobiana, antiviral, anticancerígeno y potente antioxidante (Seeram y col; 2005) ya que la cáscara de granada es una fuente rica en polifenoles, tales como ácido elágico, quercetina y punicalagin (Ghasemian y col; 2006). La figura 3 presenta algunas estructuras químicas de los elagitaninos de granada.

La presencia de estos polifenoles en la cáscara de granada pueden ser los responsables de la actividad antimutagénica de extractos de cáscara (Gil y col; 2000). Se ha reportado que el jugo de granada contiene capacidad antioxidante, debido a la presencia de elagitaninos (Seeram y col; 2005).

La granada posee un alto contenido en potasio, necesario para la regulación del sistema nervioso principal. Estudios recientes han descubierto que este poder actúa más sobre las mujeres que sobre los hombres. En el cuadro 6 se muestra la caracterización fisicoquímica de la granada (cáscara).

Cuadro 6. Caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada.	
Componente	Cantidad por 100 g de muestra. (g).
Materia seca total.	94.45 ± 1.25
Humedad.	5.5 ± 1.25
Cenizas.	3.59 ± 0.08
Grasa cruda.	3.57 ± 0.38
Proteína total.	4.26 ± 0.17
Fibra cruda.	19.90 ± 1.61
Azúcares totales.	17.75 ± 0.61
Azúcares reductores.	4.34 ± 0.01
Fenoles hidrolizables totales.	6.11 ± 1.83
Fuente: Robledo-Olivo, A. 2007.	

2.14.2 Usos tradicionales de la granada (*Punica granatum*)

En casi todo el país su principal aplicación es para problemas estomacales como diarrea y disentería, mediante el uso del fruto y la cáscara o las hojas, corteza, flores y brotes; el tratamiento más recomendado es ingerir el cocimiento de una o más partes de la planta, o bien, mezclar la cocción con guayaba, hierbabuena, lima, tamarindo y otras, para tomarse tres veces al día.

Otros padecimientos tratados son los parásitos intestinales como lombrices y solitarias, para lo cual se toma la cocción concentrada a base de la corteza, raíz, hojas o la cáscara del fruto, mezclada con un poco de epazote, y el líquido obtenido se bebe en ayunas durante tres días. Se dice, además, que la granada trata el empacho, vómito, bilis, infección intestinal y fuegos bucales.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Obtención del material vegetal

La cáscara de granada (*Punica granatum*) en polvo fue proporcionada por el Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila y fue recolectada de en los municipios de Saltillo, Arteaga y Parras de la Fuente, las características del polvo fueron: Humedad < al 5%, tamaño de partícula de 600 micras, color naranja. El material se almacenó en bolsas de polietileno en un lugar seco y ausente de luz antes de su uso.

3.1.1 Preparación del extracto de cáscara de granada

Para la preparación del extracto se siguió la metodología reportada por Seeram y col (2005), para ello se preparó una solución con la cáscara de granada seca con agua en una relación 1:5 (m/v), se colocó en agitación constante por 5 horas, transcurrido el tiempo el extracto se filtró a través de tela de manta, seguido de filtración por papel whatman No. 41 y filtro del numero 4, el extracto se mantuvo en refrigeración.

3.2 Caracterización Físico-Química (análisis proximal)

La caracterización físico-química de la cáscara de granada (*punica granatum*) consistió en la determinación, por triplicado, de materia seca total, humedad, cenizas, proteína cruda, grasa, fibra, de proteína, extracto etéreo, fibra, cenizas y humedad mediante los procedimientos descritos en la AOAC de 1980.

3.2.1 Determinación de materia seca total

En la determinación de materia seca total, se pesó 1 gramo de muestra en un crisol de porcelana (el cual, previamente, se colocó en una estufa a una temperatura de 100°C hasta obtener un peso constante), posteriormente, se sometió a una temperatura de 80°C por 24 horas, se enfrió en un desecador y se registró el peso.

La materia seca total fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ materia seca total} = \frac{\text{peso de crisol con muestra seca} - \text{peso de crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.2.2 Humedad

La humedad se determinó por diferencia de 100 y los resultados obtenidos en el análisis de materia seca total.

$$\%H = 100 - \%MST$$

3.2.3 Proteína cruda

La determinación de proteína se realizó por el método Kjeldhal en el cual se colocó 1 gramo de muestra en un matraz Kjeldhal, 5 perlas de vidrio, 1 cucharada de catalizador selenio y 30 ml de ácido sulfúrico concentrado. Los matraces se colocaron en el digestor Kjeldhal a una temperatura de 100 °C hasta obtener una mezcla color verde. Una vez frías las mezclas, enseguida, se adicionaron 300 ml de agua destilada, 110 ml de hidróxido de sodio y 5 granallas de zinc. En un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Agregar 50 ml de ácido bórico al 4% y 6 gotas de indicador mixto (rojo de metilo), posteriormente se obtuvieron 250 ml de destilado de cada muestra en un matraz erlenmeyer de 500 ml de capacidad y se titularon con ácido sulfúrico 0.099 Normal (N).

El nitrógeno obtenido se calculó mediante la fórmula:

Realizar cálculos

$$\%N = \frac{(\text{ml gastados de la muestra} - \text{ml blanco}) (\text{normalidad del ácido}) (0.014)}{(100) / \text{gr de muestra}}$$

Valor del blanco: 0.5ml

Finalmente, el por ciento de proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por 6.25 factor.

$$\%P = (\%N) (6.25) \text{ nota: } 6.25 \text{ factor y es diferente en cada alimento.}$$

3.2.4 Lípidos (Extracto etéreo)

En la determinación de lípidos, se pesaron 5 gramos de muestra, colocados en un dedal de celulosa e introducido a un sifón y unidos a un matraz bola fondo plano (previamente sometido a peso constante con 5-6 perlas de ebullición y adicionado con 150 ml de hexano). Enseguida, se insertó la parte superior del sifón a un refrigerante y la muestra se reflujo por 12 horas a una temperatura de 80°C. Después de este tiempo, se evaporó el hexano contenido en el matraz, enseguida se introdujo en una estufa a una

temperatura de 105°C por 24 horas, se enfrió en un desecador silica-gel y se registró el peso.

El por ciento de grasa obtenido fue calculado mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ grasa} = \frac{\text{peso de matraz con grasa} - \text{peso de matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.2.5 Fibra cruda

El análisis de fibra cruda consistió en 2 fases: En la primera fase, se colocaron 2 gramos de muestra desgrasada en un vaso de Berzelius y 100 ml de ácido sulfúrico 0.255 N. éste se sometió a ebullición por 30 minutos y después se lavó con 100 ml de agua destilada caliente. La segunda fase, se midió 100 ml de NaOH 0.313 N y se colocó en el mismo vaso, enseguida, se calentó a ebullición por 30 minutos y se lavó con 100 ml de agua destilada caliente. La fibra obtenida se colocó en un crisol de porcelana y se introdujo en una estufa a una temperatura de 105 ° C por 24 horas. Después de este tiempo se registró el peso, del crisol y finalmente la muestra se calcinó a 600°C por 5 horas en una mufla marca Termolyne 200.

El por ciento de fibra se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ FC} = \frac{\text{peso de crisol con muestra seca} - \text{peso de crisol con cenizas}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.2.6 Cenizas

En la determinación de cenizas, se pesó 1 gramo de muestra en un crisol de porcelana (previamente sometido a peso constante) en seguida se introdujo en un mufla marca Termolyne 200 a una temperatura de 600°C por 2 horas.

El porcentaje de cenizas en la muestra se calculó mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{peso de crisol con ceniza} - \text{peso de crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

3.3 Propagación y conteo de esporas

El microorganismo empleado para la presente investigación fue la cepa de *Aspergillus niger* GH1 (aislada por Cruz-Hernández en el 2002) perteneciente a la colección del DIA-UAdeC.

Se propagó en medio Agar Dextrosa y Papa (PDA). En 30 ml de PDA (contenidos en matraces erlenmeyer de 250 ml), se inocularon esporas de *Aspergillus niger* GH1, estos se incubaron a 30 °C por 5 días y las esporas producidas se cosecharon con una solución de Tween 80 al 0.01% y se contaron en una cámara de Neubauer.

De la suspensión de esporas obtenida se realizó una dilución 1:20 (se lleva al vortex), para facilitar el conteo. A una cámara de Neubauer limpia, se le añade una pequeña gota de la dilución, enfoca en el objetivo de 10 y se localiza la cuadrícula, posteriormente se lleva al objetivo 40 y se cuentan 13 cuadros de los 25 existentes.

La ecuación para obtener el número total de esporas es la siguiente:

Suma de cuadros = (total de esporas) (25) (1x10⁴) (20)= espora por ml

13

3.3.1 Condiciones de cultivo líquido

La fermentación se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 50 mL de extracto de cáscara de granada, el cual contenía sales del medio Pontecorvo el cual tiene la siguiente composición: NaNO₃ 6 g/L⁻¹, KH₂PO₄ 1.52 g/L⁻¹, KCl 0.52 g/L⁻¹, MgSO₄ 7 H₂O 0.52 g/L⁻¹, ZnSO₄ 0.001 g/L⁻¹, metales traza 1 ml (NaB₄O₇ 10 H₂O 100 mg, MnCl₂ 4 H₂O 50 mg, Na₂MoO₄ 2 H₂O 50 mg, CuSO₄ 5H₂O 250 mg). Y se inoculó con 1x 10⁶ esporas de *Aspergillus niger* GH1 por mL de medio d cultivo. Los matraces se llevaron a incubación a 30 °C por 72 horas realizando diferentes parámetros (pH, biomasa azucares totales, fenoles hidrolizables totales, acumulación de ácido elágico y actividad enzimática elagitanasa) cada 12 horas.

3.3.2 Recuperación del extracto enzimático

El material fermentado se recuperó mediante el filtrado realizando este en bomba de vacío, se colocó un papel filtro Whatman del número 41 en el fondo de un embudo, recibiendo el extracto libre de sólidos en el papel filtro el cual a este se le conoce como biomasa, y en el matraz Erlenmeyer recibiendo el extracto líquido fermentado. Los extractos recuperados se usaron para realizar las siguientes determinaciones: pH, biomasa, azúcares totales, fenoles hidrolizables totales, proteínas, acumulación de ácido elálgico y actividad enzimática degradante de elagitaninos.

3.4 Técnicas analíticas

3.4.1 Determinación de biomasa

La separación del micelio y sólidos suspendidos del medio líquido, se llevó a cabo mediante la filtración del extracto fermentado en papel filtro Whatman 41, utilizando una bomba de vacío. Del líquido filtrado se guardó en frascos de plástico con un vol. de 50 mL y se almacenó a -40 °C para después hacer la determinación de, azúcares totales, fenoles hidrolizables totales, cuantificación de ácido elálgico y ensayo enzimático posteriormente.

La biomasa sobrante de la filtración contenida en el papel filtro se secó en una estufa a 60°C durante 24 horas. Posteriormente el papel filtro con biomasa se colocó en un desecador durante 20 min. Para ser pesado posteriormente. Al peso obtenido se le restó el peso del papel seco sin biomasa para obtener el peso seco de la biomasa.

3.4.2 Determinación de azúcares totales

El contenido de azúcares totales se evaluó espectrofotométricamente con el método de Fenol Sulfúrico (Dubois y col., 1956), se preparó una curva patrón de azúcares totales, con un estándar de glucosa a una concentración de 0-200 ppm; se colocó en tubos de ensayo 250 µL de muestra (dilución 1:100) con 250 µL de fenol al 5%, se colocó en baño de hielo los tubos con muestra y se añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente por las paredes del tubo y se pusieron los tubos a un baño en ebullición durante 5 minutos, se

enfrió las muestras a temperatura ambiente y se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 488 nm.

3.4.3 Determinación de fenoles hidrolizables totales.

Se llevo a cabo cuantificación de fenoles hidrolizables totales (Makkar, 1993), se preparo una curva patrón con una solución de estándar de ácido gálico de 0-500 ppm; se colocaron en tubos de ensaye 200 µL de muestra (dilución 1:100) se le añadió a los tubos 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, se agitaron los tubos y se dejaron reposar por 5 minutos, seguido de la adición de 200 µL de carbonato de sodio, se dejaron reposar por 1 minuto y se leyeron las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.

3.4.4 Cuantificación de ácido elágico

Para este ensayo se tomo 1.5 mL del sustrato filtrado de cascara de granada y se centrifugo a 6000 RPM por 30 minutos, se retiro el sobrenadante y al precipitado se le adiciono 1.5 mL de etanol, se sometieron a vibración sónica por 20 minutos. Las muestras se filtraron por membranas de 0.45 µm y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) utilizando el método de Amakura (2000). Las condiciones de corrida fueron las siguientes: Columna: Optisil ODS 5 mm, 250 mm, 4.6 mm, temperatura de 30 °C, fase móvil: (A) Acetonitrilo (B) Acido acético 0.3%, flujo de 1.0 mL/min, volumen de inyección de 10 µL, longitud de onda de 254 nm y un tiempo de retención de 14 minutos.

3.4.5 Actividad enzimática degradante de elagitaninos

Se colocó en tubos eppendorf 1.0mL de una solución de 1mgml^{-1} de polifenoles totales de *punica*, se agregaron 50µL del extracto enzimático obtenido en cada fracción. Los tubos se llevaron a incubar durante 10 minutos a 60°C. Transcurrido este tiempo se añadieron 200µL de HCl 1.5 M para detener la reacción. Posteriormente se procede a realizar el protocolo de recuperación de ácido elágico, las muestras se centrifugaron a 6000rpm durante 30 min y después de descartar el sobrenadante se agregó 1.5mL de etanol para solubilizar el ácido elágico, las muestras se sometieron a vibración

sónica durante 20 minutos y posteriormente las muestras se filtraron por membranas de 0.45 µm para luego ser analizadas por HPLC mediante el método reportado por Amakura en el 2000, la curva de calibración se realizó con un estándar de ácido elágico en concentraciones desde 0 a 500ppm

En el cuadro 7 se presenta la forma en que se realizó la actividad enzimática degradante de elagitaninos.

Cuadro 7 Condiciones para la determinación de la actividad enzimática degradante de elagitaninos	
Muestra	Control
Sustrato PTP 1 mL (1mg/mL ⁻¹).	Sustrato PTP 1 mL (1mg/mL ⁻¹).
Extracto enzimático 50 µL.	Incubación a 60 °C por 10 min.
Incubación a 60 °C por 10 min	HCl 2 M, 200 µL.
HCl 2 M 200 µL.	Extracto enzimático 50 µL.

$$\frac{g}{L} = \left[\frac{Vol - ensayo}{Vol - EE} \right] \left[\frac{1molAE}{302.0g} \right] \left[\frac{10_6 \mu molAE}{1mol} \right] \left[\frac{1}{120} \right] = \left[\frac{\mu mol}{LE \text{ min}} \right] = \left[\frac{U}{L} \right]$$

A partir de este último paso se siguió el procedimiento para determinar el ácido elágico mencionado con anterioridad.

4 RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se presentan los resultados y discusiones de la caracterización físico-química, el pH, consumo de azúcares totales, fenoles hidrolizables totales, producción de ácido elágico y de la enzima elagitanasa usando el extracto de cáscara de granada como sustrato en CML.

4.1 Caracterización físico química de la cáscara de granada (*Punica granatum*)

La caracterización físico-química del polvo de cáscara de granada (análisis bromatológico) muestra que es un residuo con buenas características para ser utilizado como soporte y sustrato en CML, representada en el cuadro (8).

Cuadro 8. Caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada.	
Componente	Cantidad por 100 g de muestra. (g).
Materia seca total.	90.74 ± 0.90
Humedad.	9.26 ± 0.90
Cenizas.	3.42 ± 0.09
Grasa cruda.	0.88 ± 0.04
Proteína total.	4.00 ± 0.19
Fibra cruda.	14.30 ± 1.89
Azúcares totales.	16.40 ± 0.07
Azúcares reductores.	6.78 ± 0.84
Fenoles hidrolizables totales.	3.47 ± 0.18
Pectina	4.53 ± 0.27

Los resultados obtenidos en nuestra caracterización, concuerdan con la de otros trabajos realizados, (Seeram y col, 2005; Robledo-Olivo, 2007). Donde obtienen cantidades exactas comparadas con la de nuestra caracterización.

4.2 Resultados en graficas de pH, biomasa, azucares totales, fenoles hidrolizables totales, ácido elágico y actividad enzimática elagitanasa a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C

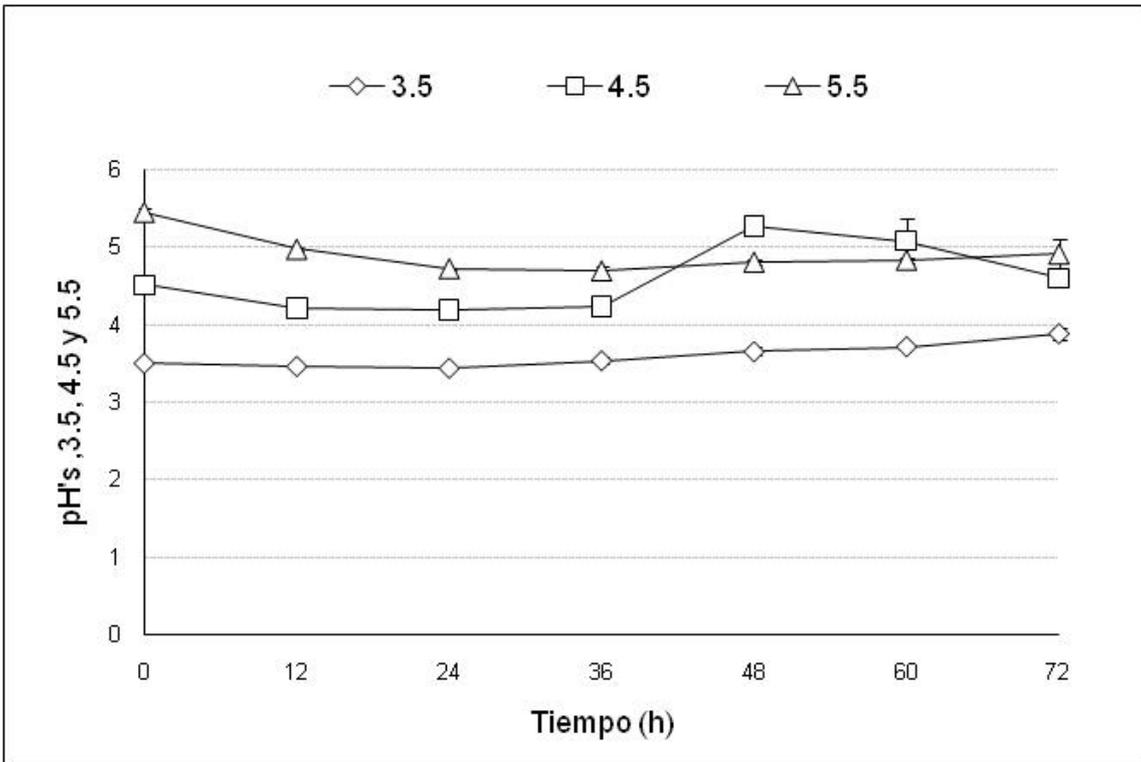


Figura 3. Curva cinética del potencial hidrogeno a diferentes pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C.

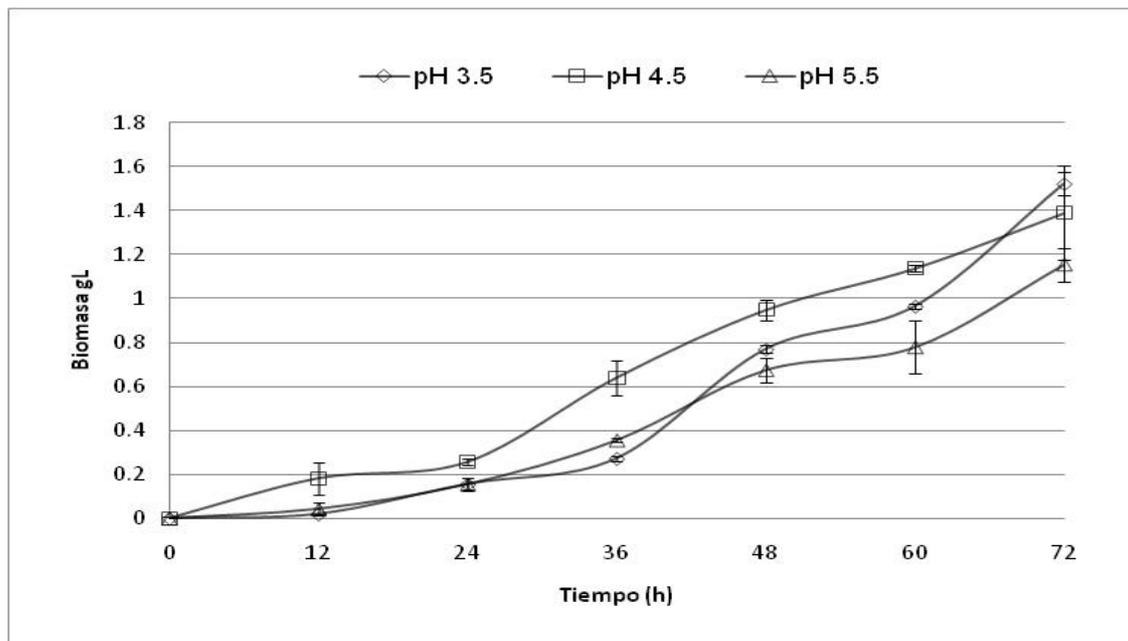


Figura 4. Curva cinética de producción de biomasa en función del tiempo, a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C.

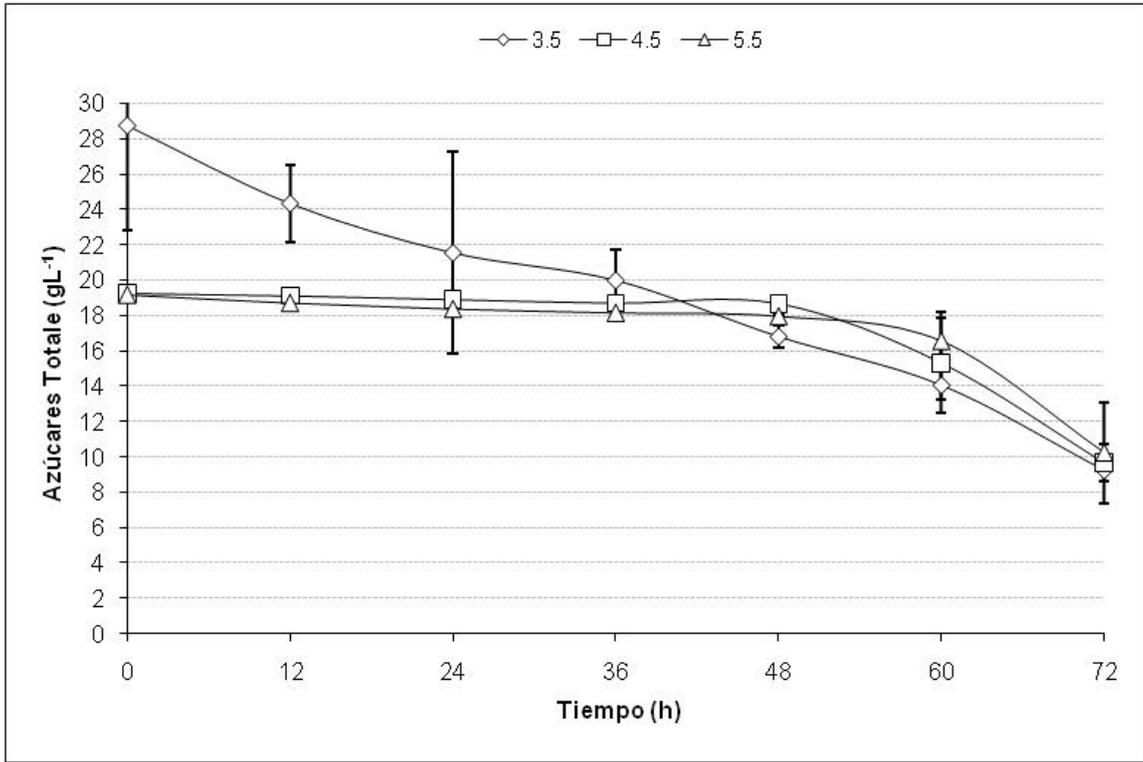


Figura 5. Consumo de azúcares totales por *A. niger* GH1 durante la fermentación a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C

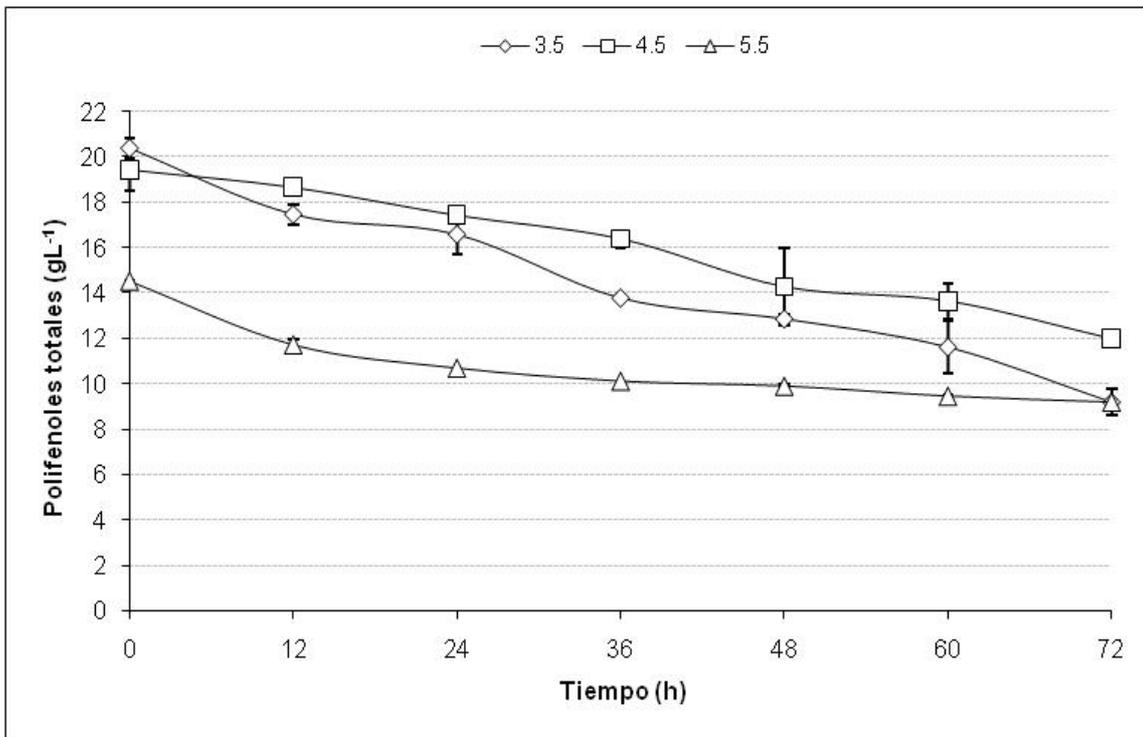


Figura 6. Consumo de polifenoles totales por *A. niger* GH1 durante la fermentación a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C

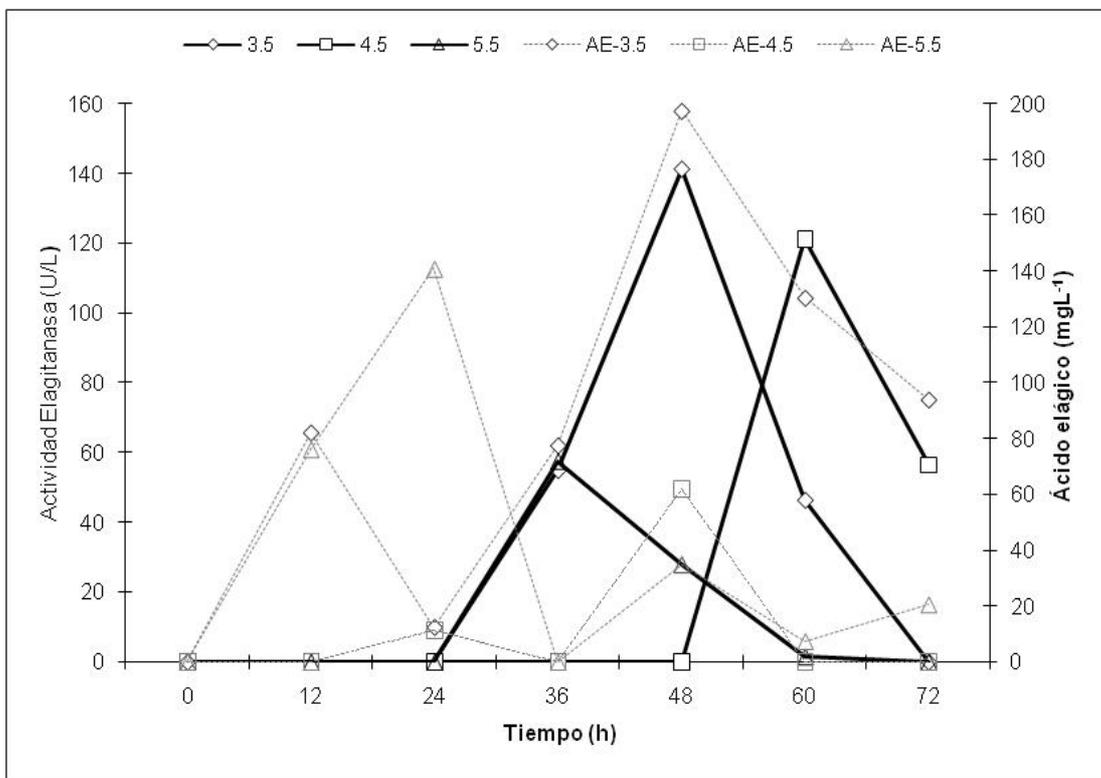


Figura 7. Liberación de ácido elágico y actividad enzimática por *A. niger* GH1 durante la fermentación a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C

4.3 Resultados en graficas de pH, biomasa, azúcares totales, fenoles hidrolizables totales, ácido elágico y actividad enzimática elagitanasa a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C

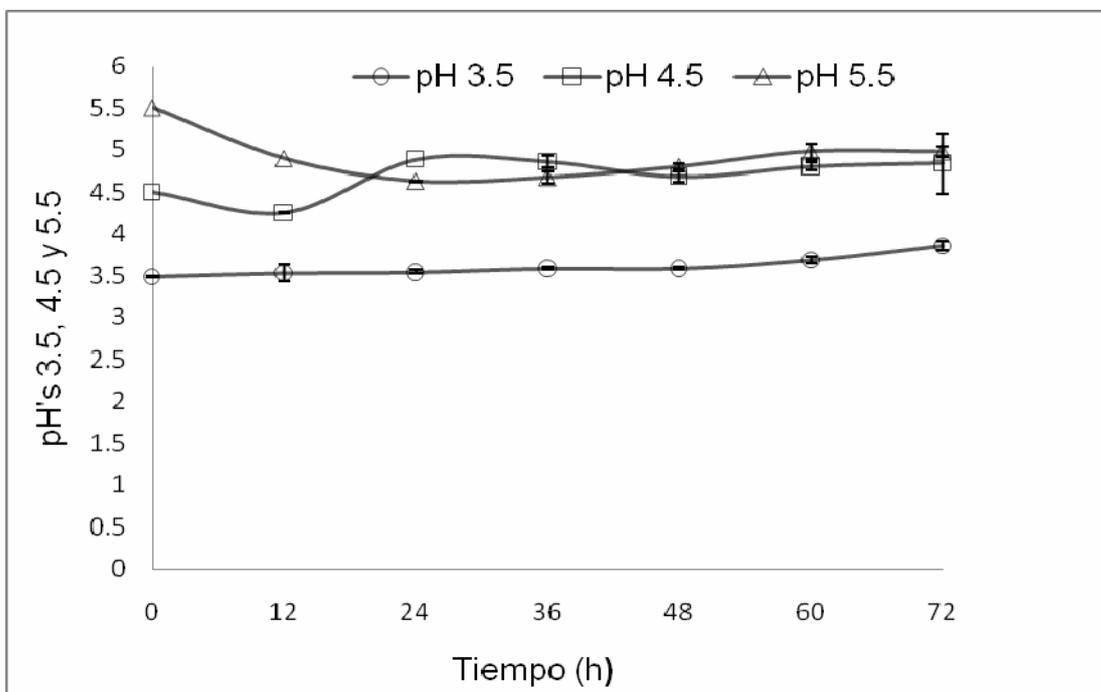


Figura 8. Curva cinética del potencial hidrogeno a diferentes pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C

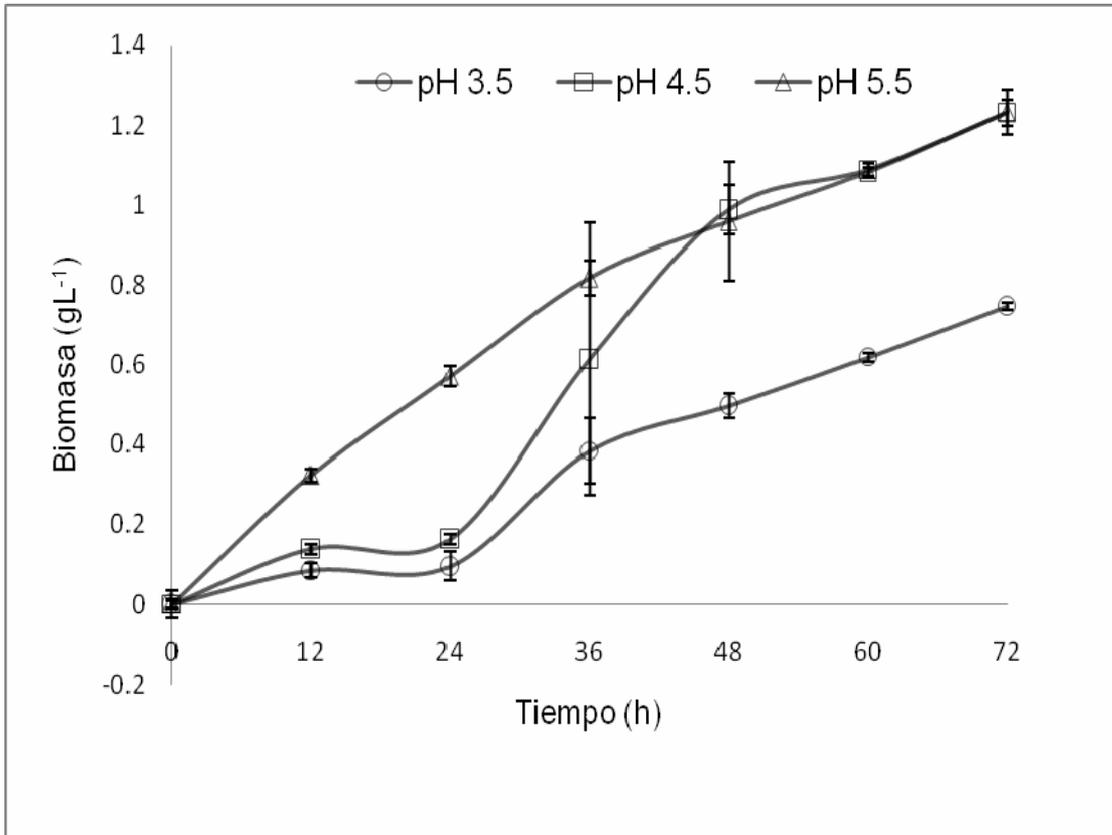


Figura 9. Curva cinética de producción de biomasa en función del tiempo, a pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C

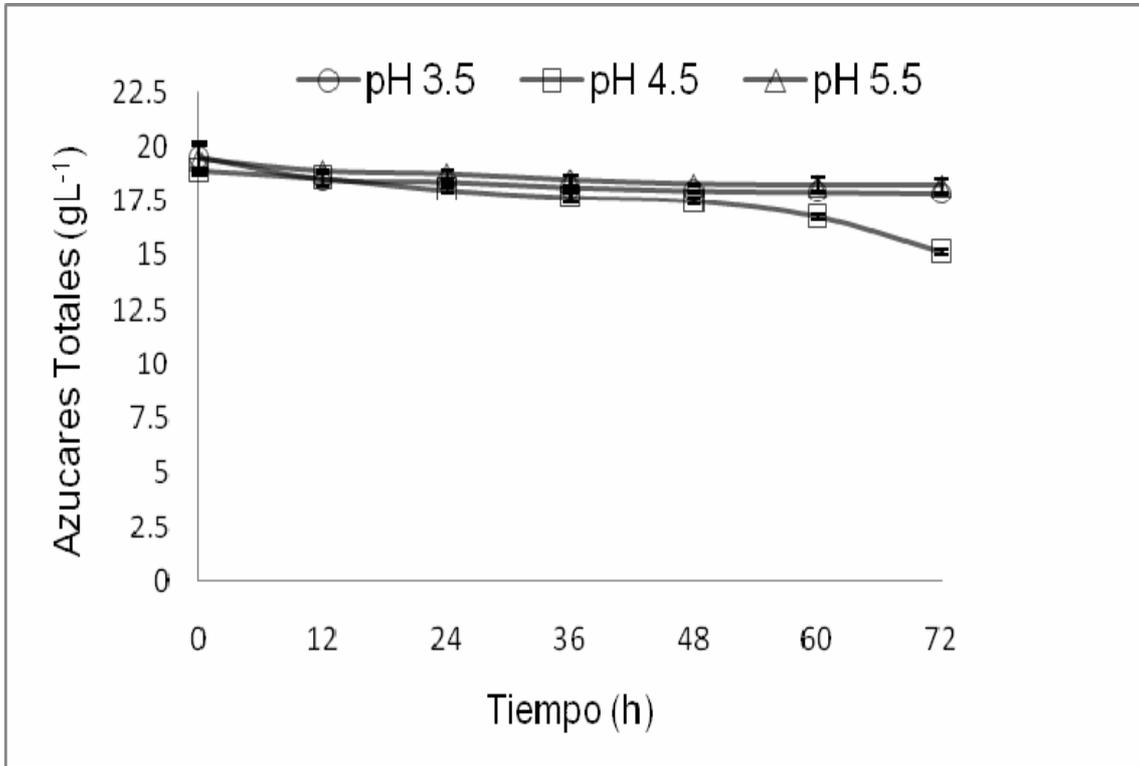


Figura 10. Consumo de azúcares totales por *A. niger* GH1 durante la fermentación a pH' de 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C

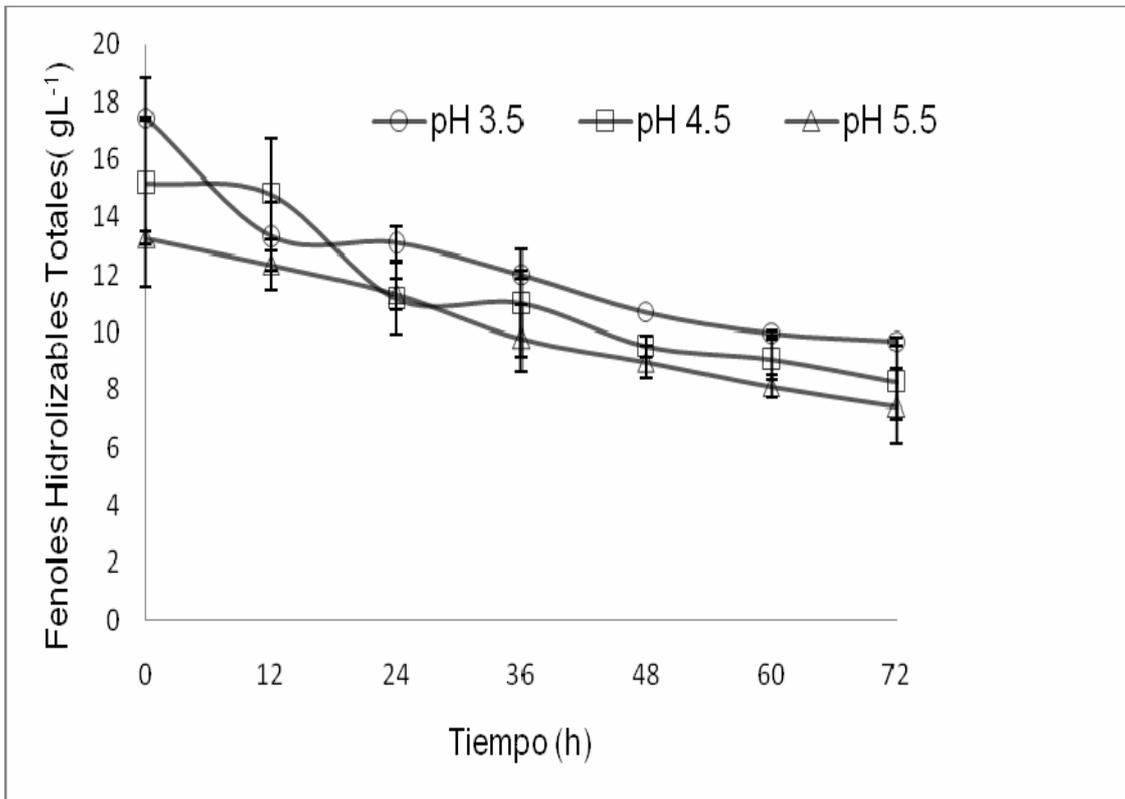


Figura 11. Consumo de polifenoles totales por *A. niger* GH1 durante la fermentación a pH' de 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C

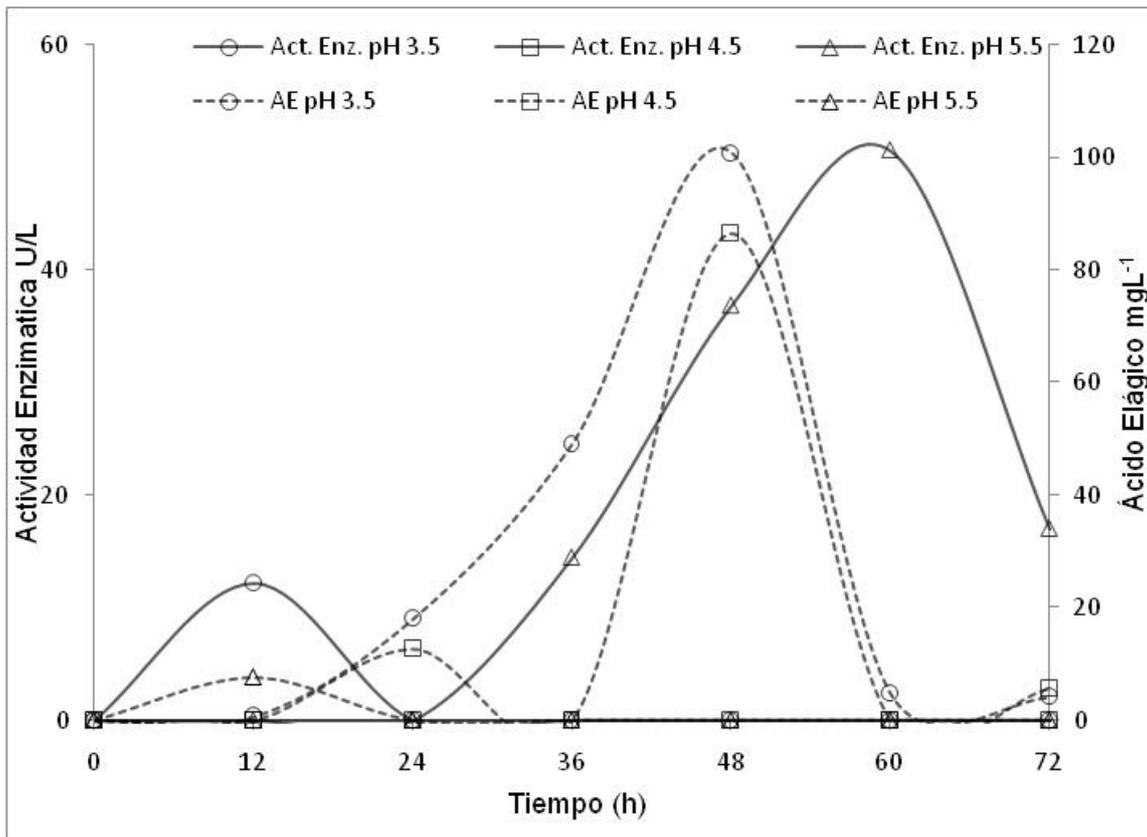


Figura 12. Liberación de ácido elálgico y actividad enzimática durante la fermentación por *A. niger* GH1, pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C

En esta siguiente sección se describe la comparación de los resultados obtenidos y las discusiones sobre cada experimento de la presente investigación. En primera instancia se presentan resultados del experimento a 30 °C y posteriormente los obtenidos a 35 °C ambos a pH de 3.5, 4.5 y 5.5.

4.4 Evolución del pH en cultivo en medio líquido, 30 y 35 °C

En la figura 3, se muestra los cambios del pH en función del tiempo de cultivo. Se observa que no existe una variación significativa de los valores originales sobre todo a pH de 3.5 que se mantiene durante todo el experimento, en el caso de pH 4.5, se observa un ligero incremento a las 48 h de cultivo sin embargo, esta desciende a los niveles originales, para el pH de 5.5 se aprecia un decremento de los valores originales descendiendo al final del cultivo a pH de 5.0, sin embargo, no se considera significativo, debido a que, en los sistemas de fermentación el potencial hidrógeno se encuentra en función de las reacciones enzimáticas y los productos generados, cuando la tendencia es hacia el incremento el pH se asocia a la producción de compuestos alcalinos, y en el caso contrario a la liberación de moléculas ácidas, además el pH es un factor muy importante, para que se lleven las reacciones enzimáticas, en caso de una variación drástica, se pueden ver afectadas la estructura y actividad catalítica de las diferentes actividades enzimáticas.

En la figura 8, se muestra la evolución del pH en función del tiempo de cultivo. Se observa que no existe una variación significativa de los valores a pH de 3.5 que este se mantiene durante todo el experimento, en el caso del pH 4.5, se observa un ligero incremento a las 24 h de cultivo sin embargo, esta desciende a los niveles originales, para el pH de 5.5 se aprecia un decremento de los valores originales descendiendo al final del cultivo a pH de 5.0.

Los resultados concuerdan con los reportados por Robledo-Olivo en 2007 para la producción de ácido elálgico en cultivo en medio sólido empleando el polvo de cáscara de granada al igual que Aguilera-Carbó en 2009, En donde se monitoreo el pH del cultivo sin obtener variaciones significativas.

4.4.1 Producción de Biomasa, a pH 3.5, 4.5, 5.5 a 30 y 35 °C

Los resultados de la determinación de la producción de biomasa se observan tendencias de curvas típicas de crecimiento de microorganismos con una fase de adaptación (fase lag) de 24 h, después se presenta una etapa de crecimiento exponencial manteniéndose hasta las 72 h en todos los pH evaluados (figura 4), y se relaciona con el consumo de los sustratos, principalmente a los polifenoles lo cual se vera más adelante.

Los resultados de la determinación de la producción de biomasa se observan tendencias de curvas típicas de crecimiento de microorganismos con una fase de adaptación (fase lag) de 24 h a pH de 3.5 y 4.5, después se presenta una etapa de crecimiento exponencial manteniéndose hasta las 72 h en ambos pH, a acepción del pH 5.5 donde este no presento fase lag solamente la fase exponencial pudo ser notable (figura 9), y se relaciona con el consumo de los sustratos.

4.4.2 Consumo de sustrato como azúcares totales a pH 3.5, 4.5 ,5.5 a 30 y 35 °C

La primera fuente de sustrato disponible en el medio de cultivo son los azúcares disueltos, provenientes del extracto de granada, Robledo-Olivo en 2007 y Favadi y col. (2005) mencionan que azúcares como glucosa y fructosa en granada son de fácil asimilación por el microorganismo.

En la figura 5, se muestra el consumo de los azúcares totales a los pH evaluados, 3.5, 4.5 y 5.5, Se observó que al inicio de la fermentación con un pH de 3.5, se obtuvo una concentración inicial de 28 gL^{-1} es decir la mayor concentración de azúcares con respecto a los demás que parten de una concentración inicial de 19 gL^{-1} . La tendencia al consumo fue una disminución a las 12 horas con un consumo del 15 % a pH 3.5. A las 24 horas se tiene un consumo de 24.9%, en las siguientes horas es notorio el consumo de azucares final de 67 %. Para los pH 4.5 y 5.5 a las 12 horas presentan un consumo del 7.2 %, a las 24 horas presentan un consumo del 11 %, en las siguientes se mantiene el rango sin consumo aparente hasta las 60 horas disminuye hasta un 29 %, y finaliza con un consumo de azúcares con un 54.8 %; no hay un consumo total a cualquiera de los evaluado.

En la figura 10, se muestra el consumo de los azúcares totales a los pH evaluados, 3.5, 4.5 y 5.5, Se observó que al inicio de la fermentación, los tres pH parten de una concentración inicial de 19 gL^{-1} es decir la mayor concentración. Por otra parte la tendencia al consumo de azucares se hizo poco notorio con una disminución a las 12 h del 3% para cada pH, respecto al pH 3.5 y 5.5 a las 48 h se tiene un consumo del 6 %, en las siguientes horas es poco el consumo de azucares final del 7 %. Por otra parte el pH 4.5 a las 48 h presenta un consumo del 7 % y finaliza con un consumo del 20%, no hay un consumo total a cualquiera de los pH evaluados.

La disminución de los azucares en ambas figuras, esta asociada a las necesidades metabólicas del microorganismo, principalmente la obtención de energía para su crecimiento. Por otra parte lo reportado por Hernández-Rivera, 2008 para extracto de cáscara de granada de tamaño de $600 \mu\text{m}$ donde no presento un consumo total de azucares totales, ya que se puede deber a que la cáscara de granada no solamente contiene azúcares, también contiene compuestos fenólicos los cuales pueden ser usados como fuente de carbono.

En la presente investigación se puede deber a que las muestras obtenidas para dicho fin en el primer caso se empleo polvo de cáscara de granada proporcionada por el departamento de alimentos con las características mencionadas, después de que se termino el material se emplearon cáscaras secas las cuales fueron reducidas en un molino diferente obteniendo un tamaño de partícula menor a 1 mm y no fueron tamizadas, lo cual pudo afectar la extracción de la concentración de estos compuestos, sin embargo, no fue una limitante para la utilización de los azúcares por el microorganismo empleado

Existe la posibilidad de que este microorganismo *A. niger* GH1, al poseer una maquinaria enzimática es eficiente para la degradación de polifenoles (Cruz- Hernández y col., 2005 reporta que esta cepa puede desarrollarse a altas concentraciones de ácido tánico) sea mas fácil degradar estos compuestos que algunos polisacáridos que posee la cáscara de granada.

4.4.3 Consumo de fenoles hidrolizables totales a pH 3.5, 4.5 ,5.5 a 30 y 35 °C

Los polifenoles hidrolizables en algunos casos, son empleados como fuente de carbono y energía por los microorganismos, en este caso particular como ya se mencionó la cepa de *A. niger* GH1, tiene la capacidad de crecer en concentraciones altas de estos compuestos.

En la figura 6, se muestra el consumo de polifenoles en función del tiempo para cada pH evaluado pH 3.5, 4.5 y 5.5, a la temperatura de 30 °C. Se observa un consumo de polifenoles totales, la concentración inicial a un pH de 3.5 fue de 20.3 gL⁻¹ presentando un consumo de los mismos en forma constante para finalizar con un consumo del 54.9%. Con respecto al pH 4.5 fue muy similar el comportamiento que el pH 3.5, solo que la concentración inicial de este de polifenoles totales es de 19.4 gL⁻¹, esto difiere de la adaptación del hongo con respecto a su metabolismo de un pH ácido 3.5 a pH ligeramente alcalino 4.5, y en consecuencia se observo una tasa de consumo ligeramente menor que el pH de 3.5 finalizando con un consumo del 49.3%. En cuanto al pH 5.5 en este si existe diferencia significa con respecto a los antes mencionados anteriormente, ya que parte de una concentración inicial de polifenoles totales de 14.4 gL⁻¹, teniendo a las 12 horas de fermentación un consumo de 19.4%, a las 24 horas presenta un consumo del 27.4%, y a las 36 horas presenta un consumo del 30.4%, se mantiene el rango para finalizar con un consumo del 6.8%. Esto muestra que el microorganismo fue capaz de degradar los polifenoles presentes en el extracto sin embargo, el consumo fue de alrededor del 50 % para pH de 3.5 y 4.5 y solo un 30 % para pH de 5.5.

En la figura 11, se muestra el consumo de polifenoles en función del tiempo para cada pH evaluado pH 3.5, 4.5 y 5.5, con respecto a la temperatura de 35 °C. En los que se observa el consumo de polifenoles totales, la concentración inicial a un pH de 3.5 fue de 17.4 gL⁻¹ presentando un comportamiento diferente a los azúcares, presentando un consumo de los mismos a las 12 horas de fermentación un 23%, se mantiene en consumo constante para finalizar con un consumo del 44.3%. Con respecto al pH 4.5 muestra un comportamiento diferente al pH 3.5, la concentración inicial de este

de polifenoles totales es de 15.1 gL^{-1} , observándose una tasa de consumo ligeramente menor que el pH de 3.5 finalizando con un consumo del 45.5%. Por otra parte al pH 5.5 en este si existe diferencia con respecto a los antes mencionados anteriormente, ya que parte de una concentración inicial de polifenoles totales de 13.2 gL^{-1} , teniendo a las 12 horas de fermentación un 6.9%, a las 24 horas presenta una concentración del 27.4%, viendo el consumo de continuamente azucres hasta finalizar con un 44%. Esto muestra que a esta temperatura y cada pH, el microorganismo fue capaz de degradar los polifenoles presentes en el extracto sin embargo, el consumo fue de alrededor del 70 % para pH de 3.5 y 5.5 y solo un 60 % para pH de 4.5.

El consumo de fenoles hidrolizables totales, se debe a que los polifenoles de mayor peso molecular son degradados a moléculas de menor tamaño (Monómeros o dímeros). Los polifenoles hidrolizables de cáscara de granada reportados en la literatura son los elagitaninos, tales como punicalagin, punicalin, ácido galaeláxico y glicósidos de ácido eláxico (El-Toumy y Rauwalda 2002; Machado y col., 2002; Seeram y col., 2005).

4.4.4 Acumulación de ácido eláxico y actividad elagitanasa a pH 3.5, 4.5, 5.5 a 30 y 35 °C

En la figura (7) se muestra la liberación de ácido eláxico y actividad enzimática, a diferentes pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 30 °C. Durante la fermentación a pH de 3.5 se observa la mayor acumulación de ácido eláxico a las 48 h de 197.4 mgL^{-1} , a un pH de 4.5 se obtuvo una acumulación de 61.7 mgL^{-1} también a las 48 h, en cuanto al pH de 5.5 se obtuvo una acumulación de ácido eláxico de 76.2 mgL^{-1} , a las 24 h. Los resultados obtenidos comparados con actividad enzimática elagitanasa solo se relacionan de manera directa a pH de 3.5, obteniéndose la mayor acumulación de ácido eláxico (197.4 mgL^{-1}) con la mayor actividad enzimática (141.2 UL^{-1}) a las 48 h, en el caso del pH de 4.5 no hay una correlación directa ya que la acumulación de ácido eláxico (61.7 mgL^{-1}) se da a las 48 h de cultivo y la actividad enzimática (121 UL^{-1}) a las 60 h de cultivo, en cuanto a la actividad enzimática a un pH de 5.5 no existe relación directa con la acumulación de ácido eláxico (76.2 mgL^{-1}) y la producción de la enzima elagitanasa (57.4 UL^{-1}).

En la figura (12) se muestra la liberación de ácido elálgico y actividad enzimática, a diferentes pH 3.5, 4.5 y 5.5 a 35 °C. Durante la fermentación a pH de 3.5 se observa la mayor acumulación de ácido elálgico a las 48 h de 100.8 mgL⁻¹, a un pH de 4.5 se obtuvo una acumulación de 86.5 mgL⁻¹ también a las 48 h, en cuanto al pH de 5.5 se obtuvo una acumulación de ácido elálgico de 7.6 mgL⁻¹, a las 24 h posterior a ella no presento liberación de ácido elálgico. La disminución de la concentración del ácido elálgico después de las 48 h a pH 3.5, 4.5 y 5.5 de cultivo, posiblemente se deba a que el ácido elálgico forme complejos con otros compuestos del soporte e inclusive con las enzimas presentes en el cultivo o bien la degradación del ácido elálgico en ácido gálgico vía enzimática, por las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa (Mingshu y col., 2007; Aguilera-Carbo, y col., 2007).

Los resultados obtenidos a pH 3.5 comparados con actividad enzimática elagitanasa no hay una correlación directa con el ácido elálgico teniendo a las 12 h (0.7 mgL⁻¹) respecto a la actividad que se obtiene la mayor actividad enzimática (12.2 UL⁻¹) a las 12 h, posteriormente a las demás horas no se presento actividad, en el pH 4.5 no se presento la presencia de actividad, en cuanto al pH 5.5 este presenta actividad enzimática a las 36 h (14.4 UL⁻¹), donde presenta mayor actividad enzimática es a las 60 h (50.6 UL⁻¹) de igual forma no existe correlación directa con la acumulación de ácido elálgico siendo este a las 12 h la mayor liberación (12.1 mgL⁻¹).

Cabe mencionar que este es el primer trabajo en cultivo en medio líquido donde se evalúa la influencia del pH y la temperatura sobre la acumulación de ácido elálgico y la enzima elagitanasa. Existen otros trabajos en literatura donde se han utilizando otros materiales vegetales, Huang y colaboradores en el 2004, quienes emplearon elagitaninos de frutos de roble y *Aspergillus niger* SHL6; en donde obtuvieron la acumulación de ácido elálgico del 16.3%, en un tiempo de fermentación de 60 horas. En la presente investigación a las 48 h de fermentación se logro una producción del 1.2 % a 30 °C y 0.62% a 35 °C, con respecto a los elagitaninos presentes en el extracto de cáscara de granada, lo que representa en primera instancia 13.5 y segunda instancia 26.2 veces

menos que el grupo de investigación de Huang, y a un pH de 3.5 aun que no es muy clara la forma en que manejan sus resultados. Además menciona que es muy importante la concentración del sustrato, el pH, las fuentes de carbono y de nitrógeno durante la fermentación en medio líquido y estos son parámetros relevantes para la producción de la enzima y del ácido eláxico.

En el 2005 Shi y colaboradores obtienen un rendimiento del 12.1% y 8.9% respectivamente de ácido eláxico en una fermentación en estado líquido utilizando un medio de cultivo que contenía taninos de valonia con *Aspergillus niger* y *Candida utilis*. Donde las mejores condiciones de temperatura eran de 28 °C y valores de pH preferidos de los medios de fermentación eran de 4.5-5.0 para *A. niger*, mientras que para *C. utilis* eran valores de 4.8-5.2. Mientras en cultivo en medio sólido, Hernández-Rivera en el 2008 evaluó la producción, purificación y caracterización de la enzima de *Aspergillus niger* GH1 con capacidad degradante de elagitaninos en cascara de granada donde a las 48 h de fermentación se obtuvo una acumulación de ácido eláxico de 371 mgL⁻¹, casi dos veces más que en la presente investigación.

Vattem y Shetty en el 2002 en su trabajo de investigación utilizaron un sistema de fermentación en estado sólido con *Rhizopus oligosporus* y pomaza de arándano como medio de cultivo; utilizando como fuente de nitrógeno NH₄NO₃ y una proteína hidrolizada de pescado denominada (FPH); los extractos fenólicos se hicieron con etanol y agua, a cada tratamiento se le analizó, la capacidad antioxidante del compuesto fenólico y la cuantificación de ácido eláxico por HPLC, donde reportaron una acumulación de ácido eláxico de 325 µgg⁻¹ de pomaza de arándano en el extracto con agua en un tiempo de 96 horas.

Mientras que en el 2003 estos mismos investigadores con las mismas condiciones de trabajo, solamente cambiaron el microorganismo por *Lentinus edodes* en la fermentación en medio sólido donde reportaron una acumulación de ácido eláxico de 350 µgg⁻¹ de pomaza de arándano a las 120 h de fermentación.

5 CONCLUSIONES

- ❖ Se logro la caracterización fisicoquímica de la cascara de granada, la cual contiene las macromoléculas necesarias para la fermentación y la obtención de ácido elágico.
- ❖ Se evidencio la importancia que tienen los factores como el pH y la temperatura sobre la acumulación de ácido elágico y la expresión de la enzima elagitanasa.
- ❖ En la presente investigación se lograron títulos de producción de ácido elágico de 197.4 mgL^{-1} a las 48 horas de fermentación.
- ❖ Se obtuvieron valores de producción de actividad enzimática elagitanasa de 141.2 UL^{-1} a las 48 horas de fermentación.
- ❖ De acuerdo a los resultados obtenidos, las mejores condiciones de ensayo para la acumulación de acido elágico y expresión de la enzima es a las 48 h, a un pH de 3.5 y una temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$

6 PERSPECTIVAS DE LA INVESTIGACIÓN

- Es importante seguir evaluando otros parámetros para obtener las mejores condiciones de acumulación de ácido elágico, por lo que este trabajo solo sienta el precedente obtener las mejores condiciones de producción de esta importante molécula.
- Es necesario evaluar otros factores, en los cuales pueda asociarse a la actividad enzimática y acumulación de ácido elágico, como son la concentración de sales, sustrato, iones metálicos o bien moléculas que actúen como inhibidores de la actividad.
- Como se podrá notar, en este campo de la investigación se requiere de profundizar ya que representa una gran oportunidad desarrollo, donde si bien las investigaciones son incipientes, en los siguientes años esperaremos un mayor numero de trabajos relacionados con el tema.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, C. N. 1998. Producción de enzimas en sistemas de fermentación. Reporte interno. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México, D.F.

Aguilera-Carbo A. (2009). Producción fúngica en cultivo en medio sólido de la enzima responsable de la degradación de elagitaninos. *Tesis doctoral*. UAM-iztapalapa.

Aguilera-Carbo., Augur C., Prado-Barragan L. A., Favel-Torres E. and Aguilar C.N. (2008). Microbial Production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78: 189-199.

Aguilera-Carbo A., Hernández-Rivera J. S., Prado-Barragán L. A., Augur C., Favela-Torres E., Aguilar C.N (2007) Ellagic acid production by solid state culture using a *Punica granatum* husk aqueous extract as culture broth. Proceedings of the 5th International Congress of Food Technology. Thessaloniki, Greece.

Akiyama H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 48: 487-491

Amakura Y., Okada M., Tsuji S., Tonogai Y (2000) Determination of phenolics acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 891: 183-188

Anderson K.J., Teuber S.S., Gobeille A., Cremin P., Waterhouse A.L., Steinberg, F.M. (2001). Walnut Polyphenols inhibit In Vitro Human Plasma and LDL Oxidation. *Journal of Nutrition.* 131: 2837-2842.

Ani V., M. C. Varadaraj, K. Akhilender Naidu (2006) Antioxidant and antibacterial activities of polyphenolic compounds from bitter cumin (*Cominum nigrum*). *Eur Food Res Techno*

AOAC (1980). *Methods of Analysis* Association of Official Analytical Chemists, Ed. William Horwitz.

Ascacio-Valdes J.A. *Tesis Licenciatura* (2007). Obtención de ácido elálgico de fuentes no convencionales. Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

Auw J. M., Blanco V., O'keefe S. F. and Sims C. A. (1996) Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet sauvignon, Chamboutun and Noble wines and juices. *Am J Enol Vitic* 47: 279-286

Bala I., Bhardwaj V., Hariharam S., Ravi Kumar M.N.V. (2005). Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. doi:10.1016/j.jpba.2005.07.006

Belmares- Cerda R., Contreras- Esquivel J. C., Rodríguez- Herrera R., Ramírez- Coronel A., Aguilar C.N. (2004) Microbial production of tannase: a enzyme with potencial use in food industry *Lebensmitt Wiss Technol* 37:857–864

Bianco M.A., Aji A., Savolainen H. (1998). Quantitative analysis acid in hardwood samples. *The Science of Total Environment* 222: 123-126

Bhat T. K., Singh B, Sharma O.P (1998) Microbial degradation of tannins – current perspectives. *Biodegradation* 9: 343-357

Bradford M, M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Anal Biochem* 72: 248- 254

Carretero M. E. (2000) Compuestos fenólicos: Taninos, *Panorama Actual Med.* 24:235 633-636

Clifford M.N., Scalbert A. (2000) Review: Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *J. of the Sci. of Food and Agric.* 80: 1118-1125

Cruz-Hernández M, A., Contreras-Esquivel J.C., Lara F., Rodríguez-Herrera R, Aguilar C.N (2005) Isolation and evaluation of tannin- degrading strains from the Mexican desert. *Z. Naturfor C.* 60: 844-848

Cruz-Hernández, M. (2002). Aislamiento y caracterización de cepas fúngicas degradadoras de taninos. *Tesis de licenciatura.* U. A. de C.

Christen, P.; Auria, R.; Villegas, E. and Revah, S. (1993). Growth of *Candida utilis* in solid state fermentation. *Biotechnology Advances.* 11: 549-557.

Daniel E. M., Krupnic A. S., Heur Y-H, Blinzler J. A., Nims R. W. and Stoner G. D. (1989) Extraction, stability and quantification of ellagic acid in various fruits and nuts. *J Food Compos Anal* 2:338-349

Da Porto C., Calligaris S., Celotti E., Nicoli M.C. (2000). Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH* Test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48: 4241-4245.

Deschemps A., Otuk G., Lebeault J. (1983) Production of tannase and degradation chestnut tannin by bacteria. *J Ferment Technol.* 61:55–59

Doussot, F.; Pardon P.; Dedier, j. and De Jeso B. (2000). Individual, species and geographic origin influence on cooperage oak extractible content (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl.). *Analysis* 28. 960-965.

Dubois M., Guiles K. A., Hamiton J. K., Rebers P. A., Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem* 21:145–149

El-Toumy S. A. A., Rauwald H. W (2002). Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Phytochemistry* 61: 971-974

Durand, A.; de la Broise, D. Blachere, H. (1988). Laboratory scale bioreactor for solid stated processes. *J. Biotechnology* 8: 59-66

Edelmann A. and B. Lendl. (2002). Toward the Optical Tongue: Flow-Through Sensing of Tannin-Protein Interactions Based on FTIR Spectroscopy. *Journal of American Chemistry Society.* 124 (49): 14741-14747

El-Toumy., Sayed A.A., Rauwald H.W. (2002). Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Pharmazie* 61: 971-974

FAO, 1953. Proyecto 5000. Las posibilidades de producción de materiales taninos vegetales. Inst. Mex. De Inv. Tec. México.

Favadi A., Berzegar M., Azizi M.H., Bayat M. (2005). Note. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grow in Iran. *Food Science and Technology International.* 11(2):113-119

Feldman, K. S., Sahahrabudhe K., Simith R. S., Sheuchenzuber. (1999). Immunostimulation by plant polyphenols: A relationship between tumor necrosis factor- production and tannin structure. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 9. 985-990.

Gamal-Elden A.M. (2001). Antioxidant mechanisms of ellagic with special focusing on metallothionein. *Tesis Doctorado.* Universidad de el Kairo

Garro G. J. M., Riedl B. y Conner A. H. (1997). Analytical studies on tara tannins. *Holzforschung* 51. 235-243.

Gil M.I., Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48: 4581-4589.

Goldstein J.L. and T. Swain. (1965). The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4:185-192.

Ghasemian A., Seddigeh M., Majd A. (2006) Peel extracts of two Iranian cultivars of Pomegranate (*Punica granatum*) have antioxidant and antimutagenic activities. *Pak. J. Biol. Sci.* 9 (7) 1402-1405

Hagerman A. 2002. Tannin chemistry ("tannin handbook). Miami University Oxford, USA.

Haslam E. (1989). Plant polyphenols– vegetable tannins revised. Cambridge University Press, Cambridge.

Haslam E. and J.E. Strangoom. (1966). The esterase and Depsidase Activities of Tannase. *Biochemistry Journal.* 99: 28-31.

Hayashi T., Maruyana H., Kasai R., Hattori K., Takasuga S., Hazeki O., Yamasaky K., Tanaka T. (2002). Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as Activators of glucose transport in Fat Cells. *Letters Plant Med.* 68:173-175.

Hernández Rivera, Juan Simón (2008) Producción, purificación y caracterización de la enzima de *Aspergillus niger* GH1 responsable de la hidrólisis del grupo HHDP de los elagitaninos. *Tesis de Maestría.* Universidad Autónoma de Coahuila. Saltilo, Coahuila, Mexico.

Hesseltine C.W. (1972). Solid State Fermentations. *Biotechnology and Bioengineering.* 14: 517 – 532

Huang W., Ni J., Borthwick A.G.L. (2005). Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus niger* SHL 6 *Process Biochemistry.* 40(3-4):1245-1249.

Huang W., Niu H., Gong, G.H., Lu Y.R. (2007a). Individual and combined effects of physicochemical parameters on ellagitannin acyl hydrolase and

ellagic production from ellagitannin by *Aspergillus oryzae*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 30:281-288.

Huetz, P.; Mavaddat, N.; Mavri, J. (2005). Reaction between Ellagic Acid and an Ultimate Carcinogen. *J. Chem. Inf. Model.* 45:1564-1570

Ito H., Miyake M., Nisitani E., Mori K., Hatano T., Okuda T., Konoshima T., Takasaki M., Kozuda M., Mukainaka T., Tokuda H., Nishino H., Yosida T. (1999). Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. *Cancer letters* 143: 5-13.

Jin Z. X., Ito H. and Yoshida T. (1998) Dimeric and trimeric ellagitannins from *Corylus heterophylla*. *Phytochemistry* 48:333-338

Kaponen, J.M. and A.M. Happonen. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (55) 1612-1619.

Khanbabaee K. and van Ree T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Products Reports.* 18:641-649.

Kellof, G. J.; Boone, C.W.; Crowell, J.A.; Steele, V.E.; Lubet, R.; Sigman, C.C. (1994). Chemopreventive Drug Development: Perspectives and Progress. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention.* 3:85-98

Khenouf S., Hassiba Behabdallah, Kamel Ghar Zoudi, Smain Amira, Hideyuki Ito, Tae-Hoon Kim, Takashi, Yoshida y Akila Gharzoul (2003) Effect of tannins from *Quercus saber* y *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *J Agric Food Chem* 51:1469-1473

Lee J-H. and S.T. Talcott. (2002). Ellagic acid and ellagitannins affect on sedimentation in muscadine juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 50: 3971-3976.

Lei Z., Jervis J., Helm R.F. (2001). Use of Methanolysis for the Determination of Total Ellagic and Gallic acid Contents of Wood and Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49:1165-1168.

Lei Zhentian. (2002). *Monomeric Ellagitaninins in Oaks and Sweetgum*. Doctoral dissertation. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment. April 25, Blacksburg, Virginia, U.S.A.

Lin T. Y. and Vine R. P. (1990) Identification and reduction of ellagic acid on *muscadine* grape juice. *J Food Sci* 55:1607-1609

Losso, J.N.; Bansode, R.R.; Il, A.T. Bawadi, H.A. Truax, R. (2004). In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J. of Nutritional Biochemistry*. 15(11): 672-678.

Machado T.deB., Leal I.C.R., Amaral A.C.F., dos Santos K.R.N., da Silva M.G., Kuster R.M. (2002). Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. *Journal Brazilian of Chemistry Society*. 13(5):606-610.

Makkar H. P. S., Blümmel M., Borowy N. K., Becker K (1993) Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *J Sci Food Agric* 61:161–165

Manach C. and Scalbert A. 2005. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* (79) 727-747

Martens-Talcott S.U., Talcott S.T., Percival S.S. (2003). Low Concentrations of Quercetin and Ellagic acid Synergistically Influence proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells¹⁻³. *Journal of Nutrition*. 133:2669-2674.

Masamune A., Satoh, Kazuhiro Kicata, Noriaki Suzuki, Kennichi Satoh, Tooru Shimosegawa (2008) Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochemical Pharmacology* 70:869-878

Méndez R. A. 1984. Determinación de energía metabolizable y efecto de la utilización de sorgos con diferente contenido de taninos. Tesis licenciatura U. A. Ch.

Moo-Young M.; Moreira A. R. Tengerdy R. P. (1983). Principles of the Solid Substrate Fermentation. In *Filamentous Fungi*. 4. Ed. J. E. Smith, D. R. Berry and B. Kristianse, Edward Arnold, 117-144.

Mudgett, R. E. (1986). Solid State Fermentation. In: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Ed: Demain. Mo Graw Hill, New York, Londres, Paris. 7: 66-83

Mueller-Harvey I. (2001). Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology* 91:3-20.

Niemetz R., Schilling G., Gross G.G. (2000). Ellagitannin biosynthesis: oxidation of pentagalloylglucosa to tellimagrandin II by an enzyme from *Tellima grandiflora* leaves. *Chemical Communications* 35-36.

Niemetz R. and G.G. Gross (2003). Oxidation of pentagalloylglucosa to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves. *Phytochemistry* 62: 301-306.

Nonaka G. I., Sakai R. and Nishioka I. (1984) Hydrolysable tannins and proanthocyanidins from green tea. *Phytochemistry* 23:1753-1755

Notka F., Meiel G., Wagner R. (2004). Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Research* 64(2): 93-102.

Olivares, S. C. (1983). Determinación del contenido de taninos vegetales en Acacia. Phosopsis y Quercus. *Tesis licenciatura*, Instituto Tecnológico de Estudios Superiores de Monterrey.

Osawa, R., Kuroiso, K., Goto, S. and Shimizu, A. (2000). Isolation of Tannin-Degrading lactobacilli from Humans and Fermented Foods. *Applied Environmental Microbiology*. 66(7): 3093-3097.

Przewloka S.R., Shearer B.J. (2002). The further chemistry of ellagic acid II. Ellagic acid and water-soluble ellagates as metal precipitants. *Holzforschung* 56:13-19.

Patente: Comisión de Patentes Europeas, Oficina Española de Patentes y Marcas, No. De publicación ES 2032899, No. de Solicitud Europea: 888109207.6. Fecha 14-12-1988.

Quintero-Ramírez, Rodolfo (1990). Ingeniería bioquímica, teorías y aplicaciones. Crecimiento microbiano, Ed. Alhambra Mexicana, S.A de C.V., pag. 27-35.

Raimbault M. Alazard D. (1980). Culture Method to study fungal growth in solid state fermentation. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn.*, 9: 199-209.

Robledo-Olivo, A. (2007). Obtención de ácido elágico mediante la degradación fúngica de elagitaninos en cultivo en medio sólido. *Tesis de Maestría* Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

Righelato, R.C. 1975. Growth kinetics of mycelial fungi. In: *Filamentous fungi. Industrial mycology*, Smith, J. E., Berry, D. Edit. Edward Arnold, London. Vol 1.

Ruibal, B.I.J., Marta Dubed E.M., Martínez F.L., Noa R.E., Vargas G.L.M., y Santana R.J.L. (2003). Inhibición de la replicación del virus de Inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus Caribaea* Moret. *Revista Cubana de Farmacia*. 37(2): 1-8.

Saavedra, P.A.G., Couri, S., Ferreira, L.S.G. and Sousa, de B.E. (2005). Tannase: Conceitos, Produção e Aplicação. *B.CEPPA, Curitiba*. 23(2): 435-462.

Salminen, J-P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., Pulkkinen, P. (2004). Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *J. of Chemical Ecology*. 30(9):1693-1711.

Saucedo-Pompa, S; Rojas-Molina, R; Aguilera-Carbo, A. F; Saens-Galindo, A; Garza de la H; Jasso-Cantú, D; Aguilar, C.N (2009), Edible Film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*. 42: 511-515

SIACON (2006). Sistema de información agroalimentaria de consulta. (http://www.oeidrus-tamaulipas.gob.mx/cd_anuario_06/SIACON_2007.html)

Solomon, R. 1975. Growth of *Aspergillus* in liquid fermentors. En *Filamentous fungi (Industrial mycology)*. Smith, J. E., Berry, D. Eds. Edward Arnold, London. Vol.

Sharma, S.; Bhat, T.K.; Dawra, R.K. (2000). A spectrophotometric Method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical biochemistry*. 279:85-89.

Shi, B.; He Q.; Yao K.; Huang W. and Li Q. (2005). Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80: 1154-1159.

Swain, R. G. 1979. Photometrische bestimmung von gallosaure durch farbbreaktion mit rhodanin. *Mikrochimica Acta*, 809-814.

Vattem, D.A. and Shetty K. (2002). Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporum*. *Food Biotechnology*. 16(3): 189-210.

Vattem, D.A. and Shetty K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidants activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpo*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry* 39:367-379.

Viniegra G. G., Favela T. E., Aguilar G. C., Romero G. S., Díaz G. G and Augur C. (2002). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. *Biochemical Engineering Journal* 1643: 1-11

Wilson, T.C and A.E. Hagerman. (1990). Ellagitannins in plant are hydrolyzed to release ellagic acid, which forms a colored product upon reaction with nitrous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38: 1678-1683.

White T. (1957) Tannins- their occurrence and significance. *J Sci Food Agric* 8: 377- 385

Yoshida, T.; Amakura, Y.; Koyura, N.; Ito, H.; Isaza, J.H.; Ramírez, S.; Peláez D.P.; Renner, S.S. (1999). Oligomeric hydrolysable tannins from *Tibouchina multiflora*. *Phytochemistry*. 52: 1661-1666