

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



**DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE GRANADO PARA LA OBTENCIÓN DE
COMPUESTOS DE INTERÉS AGROALIMENTARIO**

Presentado por:

ANA LIDIA RUEDA ALTUNAR

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para Obtener el Título Profesional de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Buenavista Saltillo, Coahuila, México

NOVIEMBRE 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

**DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE GRANADO PARA LA OBTENCIÓN DE
COMPUESTOS DE INTERÉS AGROALIMENTARIO**

Presentado por:

ANA LIDIA RUEDA ALTUNAR

TESIS

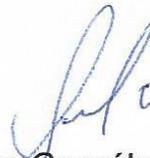
Que somete a consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

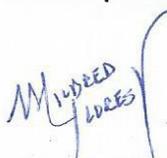
APROBADO POR:



Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor principal



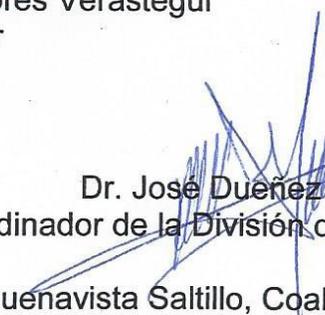
Dra. Susana González Morales
Asesor



M.C. Mildred I. M. Flores Verástegui
Asesor



Ing. Gilberto Abdón Aguilar
Asesor



Dr. José Duñez Alanís
Coordinador de la División de Ciencia Animal

Buenavista Saltillo, Coahuila, México



NOVIEMBRE 2017

DEDICATORIA

A mi familia

A mis padres, Bartolomé y Eleuteria, por darme la vida, por siempre estar conmigo en cada momento, dándome su apoyo incondicional. Muchas gracias por enseñarme a ser una persona de bien, a luchar por mis sueños, a cumplir las metas que me propongo y sobre todo siempre confiaron en mí. Ustedes han puesto los cimientos de la persona que soy hoy en día y les estaré eternamente agradecida. Porque a pesar de las distancias, sé que estamos juntos de corazón. Ustedes son mi gran ejemplo. Esto es por ustedes, mi agradecimiento infinito.

A Mis Hermanos

Carlos, Alfredo, Sebastián, Guadalupe, Ricardo Manuel, Ezequiel y Martha Soledad, gracias a ustedes por ser siempre participes en mi vida, por compartir con ustedes muchos momentos de alegría, siempre estaré agradecida por cederme esa confianza de que podía lograr mi meta. Puedo decirles hoy, que lo conseguí por ustedes, gracias por estar en un momento tan importante en mi vida.

A Cristófer, por ser una persona especial en mi vida, por estar siempre conmigo e inclusive en los momentos más difíciles, siempre ayudándome incondicionalmente. Tú siempre serás mi apoyo y mi compañero en el camino de la vida, tú simplemente eres un todo dentro de mi infinita existencia. Tú me apoyas con cada pensamiento o decisión que yo decido tomar, siempre dándome el mejor consejo y hacerme entender cuál es lo correcto. Sabemos que no fue sencillo culminar con éxito este proyecto, sin embargo, con tu impulso y confianza que me brindas siempre, pudimos lograrlo, sabiendo que lo conseguiría perfectamente y así fue. Eres especial en mi vida, muchas gracias por estar en mi camino, Te Amo.

A Mis Abuelos

Gracias por todos sus apoyos y ejemplos, ustedes me han enseñado muchas cosas vitales para la vida y encaminándome por el buen sendero, por sus sabios consejos que me orientan por el camino recto de la vida. Gracias a ustedes por siempre alentarme a seguir adelante, siempre los recordaré.

Gracias a todas las personas que fueron participes de este proceso, agradezco por su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en dónde estén, quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado. Gracias a todos ustedes, fueron los responsables de realizar su pequeño aporte y por hacer que este gran esfuerzo se volviera realidad. Mi agradecimiento infinito.

MUCHAS GRACIAS

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por llenarme de bendiciones a lo largo de mi vida, por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera así permitiendo terminar este proyecto, siendo siempre mi fortaleza en los momentos de debilidad, así como darme fuerzas para seguir adelante cumpliendo las metas que me propongo, sobre todo por estar siempre conmigo en cada momento y brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y de mucha felicidad.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por permitir darme la oportunidad de abrir sus puertas y brindar todo de su conocimiento para crecer personal y profesionalmente, la cual siempre la llevo en mi corazón a mi Alma Terra Mater.

A Mis Asesores

Dr. Armando Robledo Olivo por su apoyo durante todo este tiempo en el proyecto, por los conocimientos compartidos que fueron muy valiosos, por su paciencia, amabilidad, por su confianza, su disposición en cualquier momento y por ser una excelente persona.

M.C. Mildred Inna Marcela Flores Verástegui, por su gran apoyo, motivación, le agradezco por su tiempo compartido, sobre todo de sus conocimientos que hoy me llevo.

Dra. Susana Gonzales Morales por su aporte en este trabajo, por su apoyo y tiempo que me ha brindado para concluir satisfactoriamente con este proyecto.

Al Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos por permitir trabajar en mi proyecto de investigación en esta área, brindándome en todo momento su espacio durante el trayecto de mi carrera.

Agradezco al Departamento de Horticultura, por brindarme su espacio en este proyecto, estaré siempre agradecida.

A los docentes que fueron partícipes en mi formación en esta etapa profesional, por los consejos compartidos, siempre brindándonos sus apoyos de forma incondicional, sus experiencias en el mundo laboral, mis mejores agradecimientos.

ÍNDICE GENERAL

1	CONTENIDO	
2	INTRODUCCIÓN.....	1
3	JUSTIFICACIÓN.....	3
4	HIPÓTESIS.....	4
5	OBJETIVOS.....	4
5.1	General.....	4
5.2	Específicos	4
6	MARCO TEÓRICO	5
6.1	Granada.....	5
6.1.1	Características nutricionales de la granada	6
6.1.2	Variedades.....	6
6.1.3	Características de la variedad <i>Wonderful</i>	7
6.1.4	Información nutrimental	7
6.1.5	Composición fitoquímica	7
6.1.6	Fenoles.....	8
6.1.7	Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos.....	10
6.2	Microorganismos y los alimentos	10
6.3	Hongos	11
6.3.1	Morfología.....	11
6.3.2	Metabolismo	12
6.3.3	Reproducción	12
6.4	Fermentación	13
6.4.1	Fermentación en medio líquido	13
6.5	Biología molecular	14
6.5.1	Identificación molecular de hongos filamentosos	15
6.5.2	Extracción de ADN	15
6.5.3	Determinación de pureza y cuantificación de ADN	15
6.5.4	Espectrofotometría	15
6.5.5	Electroforesis en gel.....	16
6.5.6	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	16
7	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	17

7.1	Ubicación	17
7.2	Pretratamiento de las muestras para análisis.....	17
7.3	Caracterización fisicoquímica de los residuos de granada (<i>Púnica granatum</i> L.)	17
7.3.1	Determinación de materia seca total.....	17
7.3.2	Humedad.....	18
7.3.3	Ceniza	18
7.3.4	Grasa.....	18
7.3.5	Proteína.....	18
7.3.6	Fibra cruda.....	19
7.3.7	Azúcares Totales	19
7.3.8	Azúcares Reductores.....	20
7.4	Cepa del género <i>Aspergillus</i>	21
7.4.1	Identificación macroscópica y microscópica del hongo.....	21
7.4.2	Tinción con lactofenol (azul de algodón)	22
7.4.3	Recuento de Esporas	22
7.5	Medio de cultivo y proceso fermentativo	23
7.6	Recuperación de biomasa	24
7.7	Cuantificación de fenoles hidrolizables totales	24
7.7.1	Fenoles Hidrolizables Totales	25
7.7.2	Parámetros cinéticos asociados al crecimiento microbiano	25
7.8	Identificación molecular de la cepa seleccionada	26
7.8.1	Cuantificación de ADN.....	27
7.8.2	CALIDAD DEL ADN: Electroforesis horizontal de agarosa al 1%	27
7.8.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	28
7.8.4	Electroforesis horizontal de agarosa al 3%	30
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
8.1	Análisis proximal del residuo.....	31
8.2	Cinética de degradación de compuestos fenólicos	32
8.2.1	Cuantificación de Azúcares Totales	33
8.2.2	Cuantificación de Azúcares Reductores	34
8.2.3	Cuantificación de Fenoles Hidrolizables Totales.....	36
8.3	Biomasa.....	38

8.4	Modelamiento del proceso de degradación de compuestos fenólicos.....	39
8.5	Identificación molecular del microorganismo utilizado.	39
8.5.1	Calidad del ADN	40
9	CONCLUSIONES	42
10	BIBLIOGRAFÍA.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Datos para la preparación de curva patrón.....	20
Tabla 2: Datos para elaboración de curva patrón	21
Tabla 3: Medio de cultivo	23
Tabla 4: Datos para elaboración de curva patrón (Ac. gálico)	25
Tabla 5: Composición del medio Czapek-Dox.....	26
Tabla 6: Absorbancia a λ 260 y λ 280.....	27
Tabla 7: Composición del coctel empleado para la reacción en cadena de la polimerasa.....	29
Tabla 8: Contenido Físico-Químico de cascara de granada.	31
Tabla 9: Composición química del extracto de cascara de granada antes y después de la fermentación.	32
Tabla 10: Parámetros cinéticos asociados al crecimiento del microorganismo empleando residuos de granada como sustrato.....	39
Tabla 11: Valores obtenidos en la cuantificación de ADN por espectrofotometría.....	40
Tabla 12: Calidad del ADN.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fruto de granada en sección transversal.	6
Figura 2: Grupos que componen los polifenoles.....	9
Figura 3: Fermentación líquido en Incubadora Shaker, INNOVA 44	14
Figura 4: Identificación: A) Macroscópica y B) Microscópica de hongo filamentoso.	22
Figura 5: Suspensión de esporas en la cámara de Neubauer y diagrama para el conteo de esporas	23
Figura 6: Agarosa al 1% vertiéndose en un portagel.....	28
Figura 7: Tira de parafilm con azul de bromofenol más muestra.....	28
Figura 8: Termociclador.....	29
Figura 9: Curva para cuantificar los azúcares totales.....	33
Figura 10: Cinética de azúcares totales.....	34
Figura 11: Curva para cuantificar los azúcares reductores.	35
Figura 12: Cinética de azúcares reductores.....	35
Figura 13: Curva de calibración de ácido gálico para determinación de fenoles hidrolizables totales.....	36
Figura 14: Cinética de fenoles hidrolizables totales.....	37
Figura 15: Cinética de biomasa.....	38
Figura 16: Electroforesis con gel agarosa al 1%. Calidad del ADN, Carril: 1, cepa M4.....	41

RESUMEN

Debido a los estudios científicos que enfatizan las propiedades funcionales, la granada (*Púnica granatum L.*) variedad *wonderful* se ha convertido en un producto atractivo para el consumidor, ya que hoy se presenta la tendencia al consumo de alimentos naturales. La caracterización es un factor esencial para determinar de qué está compuesto nuestro material vegetal ya que al presentar los compuestos fenólicos forman uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, siendo muy fundamental en la dieta humana. En este trabajo se realizó la caracterización físico química de la cáscara de granada, obteniendo como resultado un valor considerado, por ello se aprovechó las propiedades que posee y seguidamente se aplicó en fermentación en estado líquido utilizando una cepa aislada de la manzana, siendo este microorganismo muy favorable en la degradación de compuestos fenólicos, por este medio se determinó el contenido de azúcares totales, azúcares reductores y fenoles hidrolizables totales, permitiendo dar información sobre los compuestos presentes.

A partir con lo anterior, se obtuvo una ecuación que permitió modelar el crecimiento del hongo donde se identificó una pronta adaptación del microorganismo a la fuente de carbono y nitrógeno. En última etapa, aunque no se logró identificar el hongo, si se pudo extraer el ADN y realizar su amplificación, para una posterior secuenciación.

ABSTRACT

Due to scientific studies that emphasize the functional properties, the pomegranate (*Púnica granatum* L.) wonderful variety has become an attractive product for the consumer, since today there is a tendency to consume natural foods. The characterization is an essential factor to determine which is composed of our plant material because when presenting the phenolic compounds form one of the micronutrient groups present in the plant kingdom, being very fundamental in the human diet. In this work, the physical and chemical characterization of the pomegranate shell was carried out, obtaining a considered value as a result, for this reason it took advantage of the properties it possesses and then it was applied in liquid state fermentation using an isolated apple strain, this microorganism being very favorable in the degradation of phenolic compounds, by this means the content of total sugars, reducing sugars and total hydrolysable phenols was determined, allowing to give information about the present compounds.

Based on the above, an equation was obtained that allowed us to model the growth of the fungus where an early adaptation of the microorganism to the source of carbon and nitrogen was identified. In the last stage, although it was not possible to identify the fungus, if it was possible to extract the DNA and carry out its amplification, for later sequencing.

2 INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad. Englobando más de 8,000 compuestos distintos, su forma más frecuente es la de polímeros o lignina insoluble (Martínez, et al., 2000; Hernández, 2015). La distribución de compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo con el tipo de compuesto químico que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martínez, et al., 2000; Hernández, 2015).

Sus principales funciones en las células vegetales son las de actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismo de defensa (Martínez, et al., 2000; Hernández, 2015).

En la actualidad este grupo de compuestos fotoquímicos presentan un gran interés nutricional por su contribución al mantenimiento de la salud humana. Así, muchas de las propiedades beneficiosas descritas en los alimentos de origen vegetal, asociadas principalmente a la actividad antioxidante y las propiedades anti nutritivas de estos compuestos, están relacionadas con la presencia y con el contenido de compuestos fenólicos (Martínez, et al., 2000; Hernández, 2015).

Los antioxidantes son conocidos como moléculas que actúan antes o durante una reacción en cadena de los radicales libres; ya sea en la etapa de iniciación, propagación, terminación, descomposición o en la subsecuente oxidación de los productos (Cardoso et al., 2005; Hernández, 2015). Por otro lado, los prooxidantes son especies altamente reactivas de radicales libres o especies reactivas de oxígeno que están presentes en los sistemas biológicos; provienen de una amplia variedad de fuentes (Hernández, 2015) y se encuentra tanto en los alimentos como en los sistemas biológicos.

En los alimentos el proceso de auto-oxidación y generación de la rancidez es causado por radicales libres como consecuencia de la peroxidación lipídica y en los sistemas vivos los radicales libres atacan moléculas biológicas claves, produciendo muchas enfermedades degenerativas. Un desequilibrio entre prooxidantes y antioxidantes en el organismo genera el fenómeno llamado estrés oxidativo, el cual es la clave en el desarrollo de enfermedades crónicas tales como cáncer, arteriosclerosis, artritis reumatoide, algunas formas de anemia, diabetes, entre otras (Hernández, 2015).

En los últimos años el interés por los antioxidantes naturales se ha incrementado dramáticamente, debido principalmente a tres razones: (1) la baja seguridad que ofrece el consumo de antioxidante sintéticos, (2) la eficacia antioxidante de una variedad de agentes fotoquímicos, y (3) la idea generalizada de que el consumo de ciertos agentes fotoquímicos pueden afectar de manera positiva la patología de las enfermedades crónicas y el proceso de envejecimiento; además, la creencia de que los compuestos naturales son innatamente más seguros que los compuestos sintéticos y por consiguiente son comercialmente más aceptados (Dorman et al., 2004).

Los antioxidantes derivados de las plantas desde el punto de vista fotoquímico pueden ser taninos, lignanos, estilbenos, cumarinas, quinonas, xantonas, ácidos fenólicos, flavones, flavonoles, catequinas, antocianinas y proantocianinas, los cuales debido a sus propiedades redox pueden actuar como donadores de hidrógenos y de esta manera prevenir o retrasar el desarrollo de enfermedades degenerativas (Marwah et al., 2007).

La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos tiene interés desde un punto de vista tecnológico y nutricional. Así, los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales de los alimentos, por lo que la obtención y preparación de alimentos con un alto contenido en estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, a la vez que se obtienen alimentos más saludables, que incluso pueden llegar a englobarse dentro de los alimentos funcionales (Hernández., 2015). Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y en el cáncer, así como en procesos de envejecimiento por lo que está siendo intensamente estudiado mediante ensayos “in vivo” e “in vitro” (Hernández., 2015).

3 JUSTIFICACIÓN

Los compuestos fenólicos poseen importantes bioactividades, tales como: actividad antioxidante, propiedades antiinflamatorias, antialérgicas, anti cáncer, antivirales y presentan protección contra enfermedades degenerativas (Hernández., 2015).

La relación entre radicales libres, antioxidantes y otros cofactores es importante en la conservación de la salud, el envejecimiento y los problemas relacionados con la edad. Los radicales libres inducen el estrés oxidativo, que es equilibrado por antioxidantes endógenos, mediante la ayuda de cofactores y por la ingesta de antioxidantes exógenos (Rahman K. 2007).

Actualmente existe un interés por el estudio de alimentos con un alto contenido de antioxidantes naturales, como son los compuestos fenólicos los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza y cuyo consumo se ha asociado con una disminución en la aparición de enfermedades cardiovasculares, así como el cáncer y otras enfermedades crónico-degenerativas que actualmente están en crecimiento.

La industria alimentaria genera una gran cantidad de residuos orgánicos los cuales son tratados de manera inadecuada, por lo que se convierten en un problema de contaminación importante, sobre todo de aguas y suelos. Las tendencias en la generación de tecnologías verdes y tecnologías limpias en pro del cuidado y protección del medio ambiente han iniciado con integración en la cadena productiva, de tal forma que a dichos residuos se les dé un tratamiento y a la vez un valor agregado.

Las tecnologías actuales apuntan al aprovechamiento de estos coproductos mediante la extracción de distintos ingredientes que pueden aplicarse en la industria alimentaria y agrícola. Así frutas y vegetales son algunos de los productos cuyos restos contienen sustancias de interés en la producción alimentaria.

De esta manera, esta investigación busca biodegradar los fenoles hidrolizables presentes en la cáscara del fruto del granado, con la finalidad de obtener un extracto rico en compuestos fenólicos monoméricos de importancia agroalimentaria.

4 HIPÓTESIS

El aislamiento de un hongo de la manzana será capaz de degradar los fenoles hidrolizables presentes en la de cáscara del fruto del granado

5 OBJETIVOS

5.1 General

Estudiar la degradación de fenoles hidrolizables presentes en la cáscara del fruto del granado mediante fermentación en medio líquido.

5.2 Específicos

- Efectuar un análisis proximal de los residuos del procesamiento del jugo de granada.
- Estudiar la cinética de degradación de fenoles hidrolizables por fermentación en medio líquido, utilizando un hongo aislado del fruto de manzana.
- Modelar la producción de biomasa y el consumo de sustrato de la degradación de residuos de granada.
- Identificar genéticamente el hongo aislado del fruto de manzana.

6 MARCO TEÓRICO

El valor económico de las frutas y hortalizas frescas está en constante crecimiento, debido al incremento en la demanda de los consumidores, quienes han mostrado mayor interés en su dieta diaria, y porque estos productos han sido reconocidos como alimentos saludables (Pretell-Vasquez, C., et al., 2016). Entre las frutas que están ganando mundialmente popularidad en los últimos años encontramos a la granada debido a su elevado valor nutricional y terapéutico (Pretell-Vasquez, C., et al., 2016). Estos efectos benéficos a la salud son atribuidos en parte a la presencia de antioxidantes que actúan como receptores de radicales libres (Pretell, et al., 2016).

Los países reconocidos como los mayores productores son India, Irán, China, Turquía y Estados Unidos. Se produce granada de diferentes variedades; sin embargo, el comercio mundial de granada está basado en la variedad Wonderful (Díaz, 2014).

En México, el estado de Guanajuato, el municipio más importante para la producción de granada es Apaseo el Alto, el cual posee el 90% de las huertas de granada, debido a las características geográficas del municipio (Díaz, 2014).

6.1 Granada

La granada pertenece a la Familia *Punicaceae* y se corresponde con la especie *Punica granatum L.* Es un fruto muy atractivo e interesante (Figura 1) ya que posee un elevado número de propiedades beneficiosas para la salud además de un excelente sabor (Vergara, 2014).

El fruto, la granada, es una baya denominada balausta de forma redonda, que tiene un color que varía de amarillo a rojo-púrpura. Poseen un diámetro de 5-12 cm y su cubierta es lisa y de textura correosa. Son esféricas, algo aplanadas y con un cáliz persistente, que puede tener una longitud de 1-6 cm. Las numerosas semillas están rodeadas de una pulpa, la parte comestible, de color rosada a rojo-púrpura, jugosa y ácida. La pulpa es algo astringente y las semillas son angulares y duras por dentro. La capa externa de la testa está cubierta por una capa delgada o pulpa jugosa, roja, rosa o blanco amarillenta, astringente y ácida (Vergara, 2014).



Figura 1: Fruto de granada en sección transversal.

Fuente: Cervantes, 2016.

6.1.1 Características nutricionales de la granada

La importancia actual de este fruto consiste en las propiedades que se han reportado en estudios recientes, revelando la presencia de componentes antioxidantes en el tallo, hojas, flores, cascara, jugo y semillas (López, et al., 2010). Estos componentes le asignan propiedades antiinflamatorias, antitumorales y anticancerígenas, entre otras, avalados por investigaciones in vitro, así como in vivo. Debido a las propiedades y su potencial como fuente de antioxidantes del fruto (López, et al., 2010).

6.1.2 Variedades

Las variedades de granado en España se catalogan, de acuerdo a la clasificación, en variedades dulces (0.15-0.48% ácido cítrico), agridulces (0.54-0.91%) y variedades agrias (2.34-2.69 % ácido cítrico), cervantes, (2015).

Variedades del fruto según Taibe, J. (2012).

- a) *Wonderful-California*
- b) *Mollar De Elche*
- c) *Acco& Shani*
- d) *Emeq*
- e) *Kamel*
- f) *Purple*

6.1.3 Características de la variedad *Wonderful*

Es la variedad más cultivada mundialmente y se empieza a recolectar a finales de septiembre hasta febrero. Es de fruto grande, de un color externo rojo profundo. Las semillas son pequeñas y medianamente duras, relativamente ácidas. Es la variedad de granado más cultivada en California e Israel. Además, presenta un contenido en sólidos solubles de entre 13-18 °Brix y una acidez de 2-3 g ácido cítrico/L (Vergara, 2014).

6.1.4 Información nutrimental

La granada es un fruto, al cual se le atribuyen excelentes propiedades sensoriales y antioxidantes, además de destacada actividad biológica con efecto antibacteriano, antiviral, anticancerígeno, antimutagénico, entre otros, por lo que es ampliamente usada en la medicina popular para el tratamiento de enfermedades de diferente carácter (Carreño, et al., 2015).

La granada se consume fresca, es dulce, con ligera acidez y agradable. La parte comestible corresponde a un 50% del peso total del fruto, 40% corresponde a los arilos y 10% semillas. Los arilos contienen 85% de agua, 10% de azúcares totales (fructosa y glucosa) y 1.5% de pectina, ácidos orgánicos (ácido ascórbico, cítrico, málico), vitaminas, minerales y compuestos bioactivos o fitoquímicos. Estos últimos son los responsables de la excelente actividad biológica (Carreño, et al., 2015).

El granado es un frutal con agradables propiedades sensoriales y es una excelente fuente de vitamina C y E (Carreño-Raga J. et al., 2015). Estas bondadosas características han permitido la apertura de un nuevo mercado en la producción de diversos productos a partir del frutal como: jugos, néctares, té, suplementos alimenticios, vinos, licores, píldoras, cremas faciales y aceites corporales (Carreño, et al., 2015).

6.1.5 Composición fitoquímica

Uno de los aspectos que ha cobrado importancia en los últimos años es el contenido de sustancias antioxidantes tales como fenoles, polifenoles y antocianinas de la granada. En recientes investigaciones, a estos componentes se les han atribuido propiedades nutraceuticas y farmacológicas (López, et al., 2010).

La granada puede ser considerada como un alimento funcional porque tiene compuestos valiosos (polifenoles) en diferentes partes de la fruta que muestran efectos funcionales y medicinales.

Actualmente existen varios estudios que indican que la cascara y el albedo de la granada presenta una gran cantidad de compuestos fenólicos, específicamente taninos hidrolizables, los cuales presentan diversas propiedades benéficas. Es por ello por lo que los extractos elaborados a partir del fruto entero, es decir, en los que se incluyen además de los arilos, la cascara y el albedo, presentan un mayor contenido de fenoles solubles totales, flavonoides y taninos hidrolizables, así como una mayor capacidad antioxidante (Díaz, 2014).

Se ha demostrado que los taninos hidrolizables de la granada pueden actuar como antioxidantes, agentes antitumorales o antihepatotóxicos, y mejorar la salud cardiovascular. Así mismo, presentan propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antivirales, antidiabéticas, y pueden mejorar la salud oral y de la piel, de la misma manera también ayudan a prevenir ciertas enfermedades (Díaz, 2014).

6.1.6 Fenoles

Los compuestos fenólicos se refieren a todas aquellas sustancias que poseen varios grupos fenol unido a estructuras aromáticas (Figura 2). Los compuestos fenólicos abarcan los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y los menos frecuentes estilbenos y lignanos.

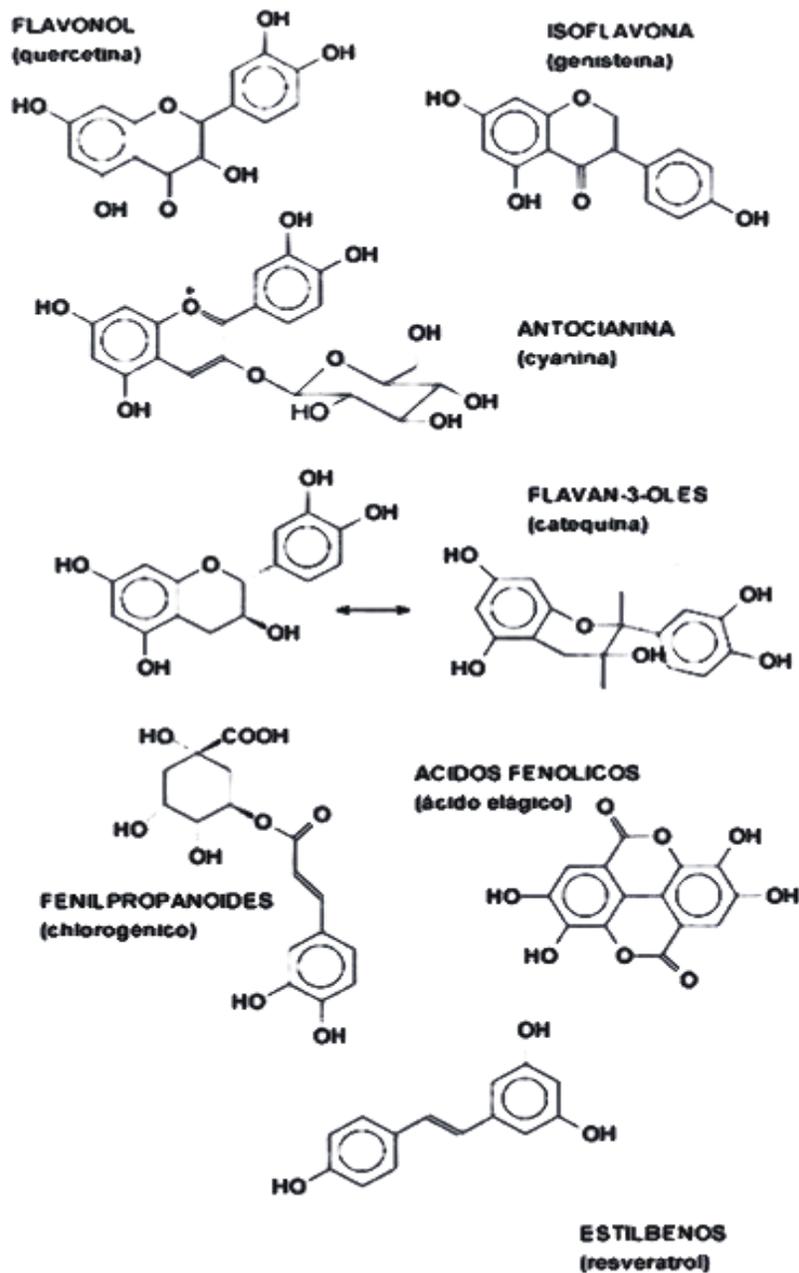


Figura 2: Grupos que componen los polifenoles
Santos, 2001

Los flavonoides: flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, isoflavonas, y antocianos.

Ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico tales como ácido gálico, y derivados del ácido cinámico, tales como ácido cumárico, cafeico y ferúlico.

Los taninos es un grupo importante de polifenoles, éstas se subdividen en dos grupos: taninos hidrolizables y taninos condensados.

El incremento de la actividad antioxidante de dichos extractos ha sido correlacionado de taninos hidrolizables, debido a que la cascara de la fruta es una rica fuente de elagitaninos (ETs), los cuales presentan el 80-85 % de los fenoles solubles totales en la cascara (Díaz, 2014).

Diversos estudios realizados sobre la composición química de la granada y más recientemente acerca de sus efectos sobre la salud, podemos considerar a la granada como un alimento funcional (Vásquez, 2015).

6.1.7 Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos

A lo largo de los años, algunos beneficios han sido atribuidos a los compuestos fenólicos, y un gran número de estudios han sugerido que el consumo de frutas y verduras pueden reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y de cáncer, potencialmente a través de la actividad biológica de los compuestos fenólicos, así como de las vitaminas como antioxidantes (Proteggente et al. 2002). Por lo que los polifenoles pueden prevenir a la oxidación lipídica, la mutación del DNA y el daño del tejido.

Un antioxidante es un compuesto químico que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Igualmente se define como compuestos que protegen el sistema celular de efectos potencialmente perjudiciales en los procesos que puedan causar una oxidación excesiva (Posada et al., 2003; Porras et al., 2009).

Los alimentos de origen vegetal, poseen una gran diversidad de compuestos fenólicos, que pueden significar una fuente natural de antioxidantes como los flavonoides, otros como las antocianinas que mejoran las características en los alimentos procesados y los taninos que contribuyen a mejorar los padecimientos de origen cardiovascular. La importancia de consumir estos productos como parte de la dieta, beneficiara a la población debido a los antioxidantes que poseen los grupos fenólicos.

6.2 Microorganismos y los alimentos

Los microorganismos son formas de vida muy pequeñas que sólo pueden ser observados a través del microscopio. En este grupo están incluidas las bacterias, los virus, los mohos y las levaduras. Algunos microorganismos pueden causar el deterioro de los alimentos entre los cuales se encuentran los microorganismos

patógenos, que a su vez pueden ocasionar enfermedades debido al consumo de alimentos contaminados. Adicionalmente, existen ciertos microorganismos patógenos que no causan un deterioro visible en el alimento. Sin embargo, por otro lado, existen también algunos microorganismos que son beneficiosos y que pueden ser usados en el procesamiento de los alimentos con la finalidad de prolongar su tiempo de vida o de cambiar las propiedades de los mismos (por ejemplo, para la fermentación llevada a cabo para la elaboración de las salchichas, el yogur y los quesos).

Los microorganismos son capaces de realizar una extensa gama de reacciones metabólicas y adaptarse a muchos ambientes diferentes (Santos, 2014).

6.3 Hongos

Los hongos forman dos grupos: los hongos filamentosos multicelulares, o hifas, y las levaduras unicelulares. El comportamiento único y distintivo de la organización celular de los hongos filamentosos presenta retos especiales al describir su forma y función. El citoplasma dentro de los filamentos tubulares se puede mover en respuesta a las condiciones ambientales, campos eléctricos, superficies y gravedad. Esta inusual formación celular distingue a los hongos filamentosos de entre el resto de los organismos del suelo y les permite formar redes de hifas que son predominantemente benéficas para la mayoría de las plantas.

6.3.1 Morfología

Los hongos forman un grupo de organismos heterogéneos en el ámbito morfológico. Unos son unicelulares y están constituidos por células aisladas, ovales, denominadas levaduras. Otros son pluricelulares y están constituidos por células alargadas, cilíndricas, de 3 a 12 μm de diámetro, dispuestas linealmente formando unas estructuras filamentosas denominadas hifas, que pueden alcanzar varios centímetros de longitud.

En algunos hongos filamentosos las hifas se entrecruzan desordenadamente formando matas con aspecto algodonoso de diversos colores que pueden verse enmohecendo alimentos, paredes húmedas y otros lugares en la naturaleza en cuanto alcanzan su tamaño macroscópico.

Los hongos filamentosos se dividen en inferiores o superiores, por las características de las hifas anchas o finas respectivamente.

El micelio se divide en dos partes, la que penetra en los sustratos nutritivos, denominada micelio vegetativo, y la que se dispone en la superficie y contiene las estructuras reproductoras, que constituye el micelio aéreo o reproductor.

6.3.2 Metabolismo

Los hongos poseen un metabolismo heterótrofo semejante al de otras células eucariotas. Los nutrientes complejos se digieren mediante exoenzimas liberadas al medio, siendo posteriormente absorbidos.

La glucólisis, seguida de la respiración aerobia o ciclo de Krebs constituyen la vía habitual para la obtención de energía a partir de la glucosa. La mayoría de los hongos son aerobios estrictos y otros son aerobios facultativos.

Un número limitado de hongos son únicamente fermentadores y son aerotolerantes.

Los hongos, como las bacterias, pueden cultivarse en medios artificiales, tienen requerimientos simples y toleran variaciones de pH y osmolaridad.

6.3.3 Reproducción

Muchos mohos pueden reproducirse también a través de esporas sexuales, generadas por meiosis, o división reductora, de un núcleo diploide (meiosporas). En la meiosis, el número de cromosomas se divide por la mitad. Las esporas sexuales contienen sólo un cromosoma de cada par homólogo. La condición diploide se restablece cuando dos estructuras haploides se unen, completando el ciclo vital. Los mohos a los que no se les conoce ciclo sexual, se consideran hongos imperfectos (Santos, 2014).

Los mohos con estructuras reproductoras sexuales (teleomorfos) corresponden a tres grupos: ascomicetos, basidiomicetos y zigomicetos. Los ascomicetos producen sus esporas en ascos, que generalmente se forman dentro de un complejo cuerpo fructífero, el ascoma. De forma similar, los basidiomicetos desarrollan sus esporas sexuales externamente, en los basidios que se hallan en un complejo cuerpo fructífero: el basidioma. Pero este grupo también comprende a los carbones y las royas, organismos de interés agronómico por ser parásitos vegetales. Los zigomicetos producen zigosporas a veces visibles a ojo desnudo. En condiciones naturales, los mohos se reproducen en la mayoría de los casos asexualmente, las estructuras reproductoras sexuales sólo aparecen ocasionalmente en circunstancias favorables (Santos, 2014).

6.4 Fermentación

El proceso conocido como fermentación implica el empleo de microorganismos para llevar a cabo transformaciones de la materia orgánica, catalizadas por enzimas. Los productos comerciales importantes de las fermentaciones industriales pertenecen a cuatro categorías principales: células microbianas, moléculas grandes como enzimas y polisacáridos, productos básicos y metabolitos secundarios que no son necesarios para el crecimiento celular. Las células utilizadas para obtener estos productos tienen una gran variedad de propiedades bioquímicas y fisiológicas. La producción comercial de productos de fermentación ha empleado principalmente diversas especies de bacterias, levaduras y hongos.

Para que un proceso de fermentación se desarrolle adecuadamente se debe establecer inicialmente el medio óptimo para el crecimiento de los microorganismos. Esto incluye la determinación de parámetros como pH, temperatura, oxígeno disuelto y nutriente, entre otros, con el fin de que el microorganismo ya sea hongo, bacteria o levadura, desarrolle apropiadamente su metabolismo y obtener de esta manera la base para un producto de interés industrial comercial.

En cualquier proceso de fermentación que sea objeto de estudio se deben evaluar una serie de variables para conocer, controlar y manipular el curso de la fermentación; estas variables se suelen dividir entre las que se pueden medir continuamente (temperatura, velocidad de agitación, presión, formación de espuma, oxígeno disuelto y pH principalmente) y las que típicamente se miden a ciertos intervalos de tiempo (formación de biomasa y de producto y consumo de sustrato básicamente).

Los microorganismos implicados en los procesos de fermentación son principalmente quimiorganotrofos, es decir, que pueden obtener su energía y su fuente de carbono por la oxidación de compuestos orgánicos. Los hongos más importantes implicados en las fermentaciones industriales se clasifican en dos grupos: los zygomycotina, con hifas aceptadas como géneros *Mucor* y *Rhizopus* y los de deuteromicotina, septados u hongos imperfectos, por ejemplo, los géneros *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillus* y *Fusarium*. En general, la producción masiva de microorganismos biocontroladores puede llevarse a cabo mediante dos técnicas fermentación líquida o sumergida y fermentación sólida o en superficie (Santos, 2014).

6.4.1 Fermentación en medio líquido

El cultivo sumergido, también llamado fermentación líquida, es el que se refiere a un sistema en el cual los sustratos están disueltos o suspendidos en un medio

acuoso y son agitados para conservar la homogeneidad del sistema, como se observa en la figura 3.

La fermentación líquida es definida como la técnica de crecimiento de microorganismos en un medio líquido, donde todos los nutrientes se encuentran disueltos en el medio de cultivo y el proceso se lleva a cabo bajo condiciones fisicoquímicas controladas, este es el método más usado por la industria biotecnológica. En comparación con la fermentación sólida, presenta las siguientes ventajas: se obtiene un producto más homogéneo, es más sencillo el control de los factores de fermentación como temperatura, aireación, agitación y pH, presenta mejor distribución de oxígeno y del calor suministrado al sistema, y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa. La fermentación sumergida se realiza principalmente usando tres métodos de eliminación de sustrato: fermentación en lote, fermentación en lote alimentado y fermentación en medio continuo (Cruz, 2007).



Figura 3: Fermentación líquido en Incubadora Shaker, INNOVA 44

Una vez que el proceso de fermentación líquida ha alcanzado nivel de producción óptima, la retirada del agua es un factor principal en el coste de recuperación de bioproducto y el procesamiento posterior.

6.5 Biología molecular

La Biología molecular, se ocupa del estudio de las bases moleculares de la vida; es decir, relaciona las estructuras de las biomoléculas con las funciones específicas que desempeñan en la célula y en el organismo.

La biología molecular concierne principalmente al entendimiento de las interacciones de los diferentes sistemas de la célula, lo que incluye muchísimas relaciones, entre ellas las del ADN con el ARN, la síntesis de proteínas, el

metabolismo, y el cómo todas esas interacciones son reguladas para conseguir un correcto funcionamiento de la célula.

6.5.1 Identificación molecular de hongos filamentosos

Taxonómicamente existen miles de especies de hongos. Por tal motivo es necesaria su identificación no solo morfológica si no también molecular y una forma de identificar estas especies es por medio de la técnica de ADN recombinante como la reacción en cadena (PCR) (Carranza, 2006).

Son numerosas las técnicas moleculares que se han utilizado para el estudio de los hongos; desde la cuantificación del contenido guanina/citosina del ADN nuclear hasta la hibridación ADN-ADN, técnicas clásicas que se han aplicado para determinar diferencias entre especies fúngicas e incluso para su identificación. No obstante, en los últimos años para tal finalidad destacan los métodos electroforéticos y de secuenciación, especialmente el análisis comparativo de secuencias nucleotídicas de un determinado gen o fragmento del mismo (Wengenack y Binnicker, 2009).

6.5.2 Extracción de ADN

La extracción y purificación del ADN son la base de cualquier protocolo en laboratorios de biología molecular y depende de la naturaleza del material inicial (micelio, esporocarpio, spora). Este procedimiento primero consiste en romper las células fúngicas, la segunda etapa remueve las proteínas celulares por precipitación dejando el ADN en solución, finalmente, el ADN genómico es concentrado y desalado por precipitación con isopropanol (Carranza, 2006).

6.5.3 Determinación de pureza y cuantificación de ADN

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen en general métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar el método de absorbancia y el de fluorescencia, la elección de estos está en función del método de extracción del ácido nucleico (Carranza, 2006).

6.5.4 Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico en la muestra.

Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280, así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de una relación

entre las lecturas a 260 y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas del ácido nucleico, esta relación debe estar entre los valores 1.8 y 2.0 (Carranza, 2006).

6.5.5 Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si esta degradado (santos, 2014).

La electroforesis es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial. Aquellas partículas cargadas positivamente migran hacia el cátodo y las cargas negativas hacia el ánodo (Sambrook y Russell, 2001).

6.5.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El impacto de la PCR en la biología molecular ha sido muy grande. Este es un método para obtener múltiples copias de fragmentos de ADN, utiliza una enzima polimerasa estable al calor y ciclos de calentamiento y enfriamiento para seleccionar y separar, sucesivamente las hebras de ADN y utilizar los fragmentos así obtenidos como plantillas para la formación de nuevo ADN completo (Carranza, 2006).

La reacción es muy sencilla, necesita cantidades de ADN muy pequeñas, algunos reactivos, una fuente de calor y unas pequeñas cadenas de nucleótidos que actúan como cebadores o primers (Sambrook y Russell, 2001).

7 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

7.1 Ubicación

Las pruebas experimentales se realizaron en el laboratorio de fermentaciones, del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, y en el laboratorio de fisiología vegetal del Departamento de Horticultura, ambos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Materia Prima: la cascara de granada de la variedad *Wonderful*, se obtuvo del proceso de elaboración de jugos de la empresa “El Baluarte”.

7.2 Pretratamiento de las muestras para análisis

La cascara obtenida fue sometida a un proceso de deshidratación a una temperatura de 70°C durante 48 horas. Después se pulverizó en una licuadora manual y se tamizó en mallas No. 10, 18 y 30, para separar las partículas de acuerdo con su tamaño.

Las muestras se conservaron en bolsas de plástico con cierres herméticos evitando que absorban humedad, en un sitio exclusivamente para materiales vegetales en el laboratorio de fermentaciones a una temperatura ambiente 20°C.

7.3 Caracterización fisicoquímica de los residuos de granada (*Púnica granatum L.*)

Una vez deshidratada la muestra, se realizó un análisis proximal en cual consistió en la determinación por triplicado de: materia seca total, humedad, ceniza, grasa, proteína, fibra cruda y pH, mediante los procedimientos descritos. También se determinó los azúcares totales, azúcares reductores y el contenido de fenoles hidrolizables totales.

7.3.1 Determinación de materia seca total

En la determinación de materia seca total, se pesó 1 gramo de polvo de granada, programando la Termobalanza PRECISA XM50 a 120°C durante 60 minutos. Se colocó el polvo en la charola de la termobalanza y se esperó a que el peso de la muestra sea constante. Con ello se obtuvo la materia seca total, y de esta forma se obtendrá la humedad de acuerdo con la diferencia de peso perdido de la muestra.

La materia seca total obtenida fue calculada mediante la fórmula:

$$\% \text{ materia seca total} = (1 \text{ gr}=100\%) \text{ de muestra} - \% \text{ de peso perdido}$$

7.3.2 Humedad

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

$$\% \text{ humedad} = (100 - \% \text{ materia seca total})$$

7.3.3 Ceniza

En la determinación de ceniza se pesó 2 gramos de polvo de granada en un crisol de porcelana (previamente se sometió a peso constante) en la estufa (SINCE 1889, YAMATO modelo DKN602C) a una temperatura de 105°C por 24 horas. Dentro de una campana de extracción se carbonizó la muestra con una parrilla eléctrica a 250°C por una hora, posteriormente se introdujo en una mufla FELISA a 500°C por 5 horas.

El porcentaje de ceniza de la muestra se calculó mediante la expresión:

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

7.3.4 Grasa

Se pesaron 5 gramos de muestra y se envolvió en un papel filtro. Se introdujo a un sifón y se unió a un matraz bola fondo plano (previamente sometido a peso constante y adicionando 150 ml de hexano). Enseguida se insertó la parte superior del sifón a un refrigerante y la muestra se reflujo durante 4 horas a una temperatura de 80°C. Después de este tiempo, se evaporó el hexano contenido en el matraz. Enseguida se sometió el matraz con la muestra obtenida al horno a 70°C por 2 horas para mantener el material seco. Después se transfirió a un desecador, para posteriormente tomar el peso en una balanza.

El porcentaje de grasa obtenida fue calculado mediante la expresión:

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

7.3.5 Proteína

Para determinar proteína se realizó por el método Kjeldahl donde se pesó 0.1 gramo de polvo de granada realizando un pequeño doblado en un papel filtro e introducir en el matraz fondo redondo de cuello largo. Añadir 4ml de solución digestora con mucho cuidado, sometiendo la muestra en el digestor Kjeldahl a una temperatura de 100°C, girar la muestra constantemente evitando evaporar la solución digestora, conforme el tiempo, se observa que la muestra toma un tono verde cristalino.

Después pasar muestra en Micro-Kjeldahl (destilación) se agrega la mitad de la muestra NaOH al 50% y esperar el destilado sumergiendo el frasco de recepción que contiene 30ml ácido bórico al 2%, previamente contenido 2 gotas de indicador de proteína, una vez observado el cambio de color a verde cristalino y obteniendo 60ml de muestra se pasará a titular con ácido sulfúrico al 0.026 N.

El nitrógeno obtenido se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(\text{ml H}_2\text{SO}_4 \text{ gastados} \times N \text{ H}_2\text{SO}_4) - (\text{ml gastados blanco} \times N \text{ blanco})}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Finalmente, el porcentaje de proteína se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.25 indicado por la AOAC (1980).

7.3.6 Fibra cruda

El análisis de fibra cruda consiste en el pesado previo de la bolsa (polímero) donde se colocó 1 gramo de muestra sellando perfectamente. Después se sumergió en éter de petróleo cubriendo correctamente por 10 minutos. Se secó pasándolo en la campana. Luego se acomodó las muestras en tubos blancos y se metió en el equipo (ANKOM 200, FIBER ANALYZER), programando una agitación de 100°C por 40 minutos añadiendo 2 litros de ácido sulfúrico al 0.255N. Se realizaron dos lavados con agua destilada caliente por 5 minutos esto para retirar el residuo. De la misma manera se lavó con NaOH 0.313N a 100°C por 40 minutos, haciendo tres lavados con agua destilada caliente por 5 minutos. Al terminar lo anterior, la muestra se sumergió en acetona cubriendo la muestra por completo durante 10 minutos para retirar cualquier exceso de grasa. Después se llevó a la campana retirando la humedad en un tiempo de 10 a 20 minutos. La muestra se colocó en una estufa YAMATO SINCE 1889 DKN602C a una temperatura de 105°C por 72 horas. Se trasladó la muestra en un crisol (a peso constante) y dentro de un desecador para registrar los pesos. Finalmente, la muestra se calcino a 500°C por 5 horas en la mufla FELISA, después se tomó el peso de la ceniza.

El % de fibra se calculó mediante la fórmula:

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

7.3.7 Azúcares Totales

Se realizó una curva patrón por el método propuesto por Dubois *et al* en 1956, mediante glucosa al 0.1%, Tabla 1. Se determinó mediante un espectrofotómetro (UV/VIS Spectrophotometer, VELAB) a 480 nm. El análisis de las muestras se

realizó por triplicado. Se pesó 0.25g de la muestra de granada en la balanza analítica (PIONEER, OHAUS). Se preparó una dilución de 0.250:25 en un vaso de precipitado de 250 ml y en una probeta de 25 ml de agua destilada. Se realizó una homogenización con la ayuda de un agitador magnético en una parrilla eléctrica (CIMAREC, Thermo SCIENTIFIC) durante 10 minutos para que la muestra se pueda diluir. Se tomó 250 μ l de la dilución con una puntilla, con la ayuda de una micropipeta automática (GLASSCO) y se colocó en cada uno de los tubos de cuarzo. Después se añadió 250 μ l de fenol al 5% de concentración, se realizó una agitación y se dejó en baño de agua fría durante 5 minutos. Luego se añadió 1 ml de Ácido Sulfúrico, se agito cuidadosamente dejando a ebullición durante 5 minutos. Se enfrió a temperatura ambiente por 5 minutos. Seguidamente se procedió a leer la absorbancia en el espectrofotómetro realizando una lectura a 480 nm.

Tabla 1: Datos para la preparación de curva patrón

Microlitros (μl) de solución de glucosa 0.1%	Microlitros (μl) agua destilada	μl de fenol al 5%	μl de ácido sulfúrico
0	250	250	1000
50	200	250	1000
100	150	250	1000
150	100	250	1000
200	50	250	1000
250	0	250	1000

7.3.8 Azúcares Reductores

Se realizó una curva patrón tabla 2, por el método propuesto por Miller para determinar azúcares reductores mediante glucosa al 0.1%. Se determinó mediante espectrofotometría (UV/VIS Spectrophotometer, VELAB) a 540 nm. El análisis de las muestras se realizó por triplicado. Se pesó 0.25 g de muestra de granada en la balanza analítica (PIONEER, OHAUS). Se preparó una dilución de 0.250:25 en un vaso precipitado de 250 ml y en una probeta de 25 ml de agua destilada. Se realizó una homogenización con la ayuda de un agitador magnético, en una parrilla (CIMAREC, Thermo SCIENTIFIC) durante 10 minutos para que la muestra se pueda diluir. Se tomó 1 ml de la mezcla de reacción y se colocó en cada uno de los tubos de cuarzo. Después se añadió 1ml de reactivo DNS, se sometió a baño maría durante 5 minutos a 90°C. Pasado el tiempo se colocó en baño de agua fría por 5

minutos para detener la reacción. Finalmente se añadió 5ml de agua destilada, se homogenizo y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a leer la absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm.

Tabla 2: Datos para elaboración de curva patrón

Microlitros de solución de glucosa 0.1%	Microlitros de agua destilada
0	1000
200	800
400	600
600	400
800	200
1000	0

7.4 Cepa del género *Aspergillus*

El microorganismo *Aspergillus* se obtuvo de la colección del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UAAAN. Se preparó agar papa dextrosa (PDA Bioxon), siguiendo las instrucciones del recipiente. Se esterilizó en una autoclave automática a 121°C durante 15 minutos. Se llevó a una temperatura de 45°C y se vació en cajas Petri. Después de enfriar, se sembró el hongo por estriado y se incubó a una temperatura de 30°C durante 6 días.

7.4.1 Identificación macroscópica y microscópica del hongo

El hongo se identificó de acuerdo a su característica, presenta: tonalidad negra, con textura, globosa, con cabeza conidial y abundante.

El hongo se observó mediante la técnica de azul de algodón que a continuación se muestra en la figura 4:

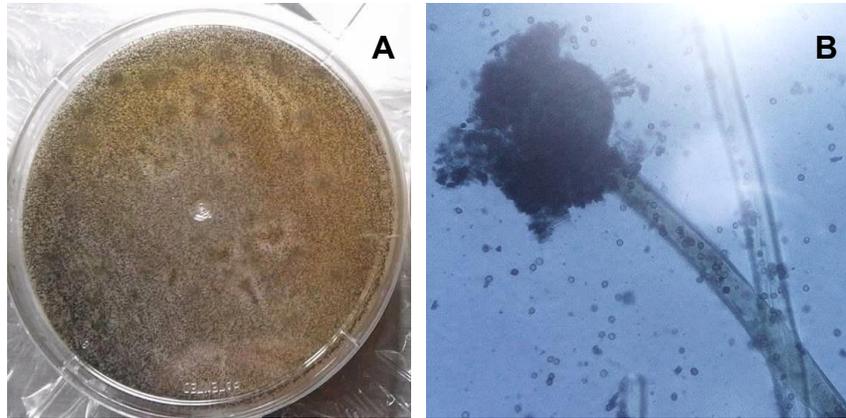


Figura 4: Identificación: A) Macroscópica y B) Microscópica de hongo filamentosos.

7.4.2 Tinción con lactofenol (azul de algodón)

Para identificar el hongo, se realizó una tinción primero se colocó una gota de azul de algodón en un portaobjeto y se tomó una muestra del hongo con la ayuda de un asa previamente quemado al rojo vivo para evitar contaminación del cultivo, se colocó sobre la gota de lactofenol seguido del cubreobjetos.

Posteriormente se procedió a observar en el microscopio (LABOMET CxL) con el objetivo 40x y capturando la fotografía.

7.4.3 Recuento de Esporas

Se basa en el recuento directo del número de células en un volumen determinado, prefijado en la cámara de recuento, mediante su observación al microscopio. El método no permite distinguir entre células viables y no viables.

En la caja Petri se añadió 20 ml de Tween 80 al 0.1% previamente esterilizada a 121°C durante 15 minutos al medio con el hongo *Aspergillus niger*. Se tomó 100 ul de la suspensión de esporas y se diluyó en 20 ml de agua destilada. Con una micropipeta se llenó la cámara de Neubauer con la suspensión de esporas después cubriéndola con un cubreobjetos. Enseguida se observó en el microscopio utilizando el aumento 40x.

Las esporas presentes se contaron en los cuadros elegidos (formando una z). Se contaron en total 13 cuadros, cinco en cada línea (cinco arriba y cinco abajo) y tres de la diagonal que cruza el centro uniendo las líneas, figura 5.

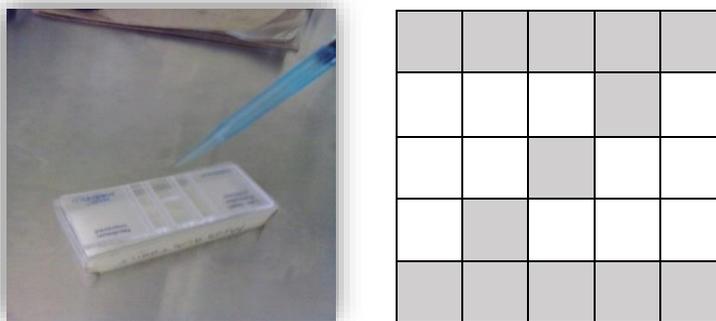


Figura 5: Suspensión de esporas en la cámara de Neubauer y diagrama para el conteo de esporas

Se estableció un cálculo para determinar el número de esporas por ml y el número total de esporas, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Esporas / mL} = \text{promedio} \times 250,000 \times \text{factor de dilución (200)}$$

7.5 Medio de cultivo y proceso fermentativo

Se prepararon 2 Litros de medio de cultivo, donde se añadió todos los componentes (Tabla 3). Se disolvieron las sales en agua destilada y se esterilizo en autoclave Tetrarium BKQ-B50II A 121°C durante 15 minutos.

Tabla 3: Medio de cultivo

Componente	g/L
KH ₂ PO ₄	4.38
Urea	8.76
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.88
CaCl ₂ Anhidro	0.09
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.01
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.12

En los matraces Erlenmeyer de 250 ml, se agregaron 1.25 g de polvo de cáscara de granada. Una vez enfriado el medio de fermentación se añadieron 50 ml en cada uno de los matraces. El medio de cultivo se inoculó con la suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 esporas/ml de medio de cultivo, de acuerdo con el cálculo realizado anteriormente. Se colocaron en incubación a 30°C y 175 rpm. La producción de compuestos fenólicos se realizó por triplicado. La degradación se monitoreó desde 0 horas hasta las 240 horas, teniendo en total 33 matraces. Se evaluó cada 24 horas hasta las 240 horas tomando un matraz en cada tiempo de muestreo. A cada una de las muestras se le determinó la cantidad de fenoles hidrolizables totales, azúcares totales, azúcares reductores, temperatura, pH y biomasa generada.

7.6 Recuperación de biomasa

Para la determinación de biomasa en la fermentación líquida, se realizó por diferencia de peso entre la muestra fresca y la muestra seca. Esto se llevó a cabo filtrando las muestras cada 24 horas con una bomba de vacío (millipore), matraz Kitazato, un embudo de porcelana a diferentes tiempos por triplicado y un papel filtro FAGA-LAB previamente pesado.

Las muestras se llevaron a la Estufa (RIOSSA E-71) a una temperatura de 70°C hasta obtener un peso constante, realizando el pesado en la balanza analítica (OHAUS PIONEER, PA214). Se realizó el registro de diferencia entre el peso del papel solo y el peso del papel con muestra a peso constante, según la fórmula abajo mencionada y reportando la biomasa como g/ml.

Biomasa = peso de papel con muestra seca - peso del papel sin muestra.

7.7 Cuantificación de fenoles hidrolizables totales

El contenido de polifenoles hidrolizables totales será determinado por medio de un método espectrofotométrico con el reactivo de Folin Ciocalteu. Este método está basado en la presencia de los ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico en el reactivo, los cuales se reducen al oxidar a los fenoles debido a la transferencia de electrones a pH básico. Esta reacción da lugar a la formación de compuestos cromógenos como óxido de molibdeno y de tungsteno de coloración azul-verde. La concentración producida es proporcional a la concentración de polifenoles presentes en la muestra.

7.7.1 Fenoles Hidrolizables Totales

El contenido de polifenoles se determinó por medio de un método espectrofotométrico con el reactivo de Folin Ciocalteu. Se pesó 0.25g de polvo de granada diluyendo en 25ml de agua destilada. El análisis de la muestra se realizó por triplicado, teniendo como estándar el ácido gálico al 1% (Tabla 4). Esta reacción consistió en adicionar 800 μl de la muestra en un tubo de ensaye. Después se añadió 800 μl del reactivo Folin Ciocalteu, realizando agitación para que las muestras pudieran mezclarse dejándolos reaccionar por 5 minutos. Enseguida se le agregaron 800 μl de carbonato de sodio anhídrido 0.01M realizando una agitación y dejándolo con un nuevo periodo de reposo de 5 minutos. Finalmente se tomó 1ml de la muestra y se realizó una dilución con agua destilada y enseguida se realizó la lectura en un espectrofotómetro a una absorbancia de 790nm.

Tabla 4: Datos para elaboración de curva patrón (Ac. gálico)

Microlitros (μl) de solución patrón	Microlitros (μl) de agua destilada	Microlitros (μl) de reactivo de Folin-Ciocalteu	Microlitros (μl) de carbonato de sodio (0.01M)	Mililitros (ml) de agua destilada
0	800	800	800	5
200	600	800	800	5
400	400	800	800	5
600	200	800	800	5
800	0	800	800	5

7.7.2 Parámetros cinéticos asociados al crecimiento microbiano

Dentro de los parámetros cinéticos se encuentran la velocidad específica de crecimiento (μ) que se obtiene por medio de la linearización de la gráfica de crecimiento y la obtención de la pendiente de la recta resultante por medio de regresión por mínimos cuadrados.

Se calculó el rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) que es la cantidad de biomasa producida por gramo de sustrato utilizado.

$$Y_{X/S} = \frac{X_2 - X_1}{S_1 - S_2}$$

Dónde:

X1 = Concentración inicial de biomasa, X2 = Concentración máxima de biomasa, S1 = Concentración inicial de sustrato, S2 = Concentración de sustrato en el valor máximo de biomasa.

7.8 Identificación molecular de la cepa seleccionada

La identificación molecular de la cepa se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación del gen 18S ADNr

Para lo cual se propagaron las cepas en medio de Czapek-Dox (Tabla 5) con glucosa al 30 % por 4 días para la mayor producción de biomasa, la cual fue filtrada para la posterior extracción del ADN.

Tabla 5: Composición del medio Czapek-Dox

Componente	g/L
KH ₂ PO ₄	3.04
MgSO ₄	1.52
KCl	1.52
NaNO ₃	0.32
Glucosa	30.00

La biomasa fue transferida a un mortero con pistilo estéril y se le agregó nitrógeno líquido para macerar la muestra y obtener un polvo blanco y fino. El polvo se transfirió a un tubo cónico (Falcón) de 50 mL estéril y se le agregaron dos volúmenes de buffer de extracción TES (Trizma base 0.01M, EDTA 0.05 M, SDS 0.5 M). Se dio una ligera agitación y se dejó incubar a -20°C durante 10 minutos utilizando el congelador (PANASONIC MPR-414F). Posteriormente la muestra fue distribuida (1.5 ml) en tubos cónicos (Eppendorf) de 2.0 mL estériles, adicionándoles 200 µL de acetato de potasio y 150 µL cloruro de sodio 5 M, se incubó la muestra en el congelador a -20°C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó a 13,500 rpm por 20 minutos a 4°C; se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo estéril. Se adicionó 0.5 veces del volumen inicial de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 13,500 rpm por 10 min a 4°C.

Nuevamente se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo estéril y se agregó 0.1 veces de acetato de amonio 7.5 M y 2 veces de etanol frío al 70%. Se incubó en el congelador a -20°C durante toda la noche.

Posteriormente, se centrifugó a 13,500 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó y se agregó 500 µL de etanol y se dejó evaporar. Después, se agregaron 50 µL de buffer TE 0.1X para disolver la pastilla.

7.8.1 Cuantificación de ADN

Para cuantificar el ADN se utilizó un espectrofotómetro marca Thermo Scientific con el método para medir ácidos nucleicos, se midió el blanco (agua milli-Q) y posteriormente las muestras. Para medir la muestra se agregaron 2 µl de muestra y 198 µl de agua milli-Q, y se tomaron los datos de absorbancia a una longitud de onda (λ) de 260 nm, 280 nm, y el valor R. Se realizó la tabla 6 de la siguiente manera:

Tabla 6: Absorbancia a λ 260 y λ 280.

Muestra	λ 260	λ 280	R	µg/ml	µg totales (50 µl)
Código de la muestra	Abs	Abs	=A260/A280	=(A260)(100)(50)	=(µg/ml)(0.05)

7.8.2 CALIDAD DEL ADN: Electroforesis horizontal de agarosa al 1%

En un vaso de precipitado se disolvieron 1.5 g de agarosa en 150 mL de buffer TBE 0.5x (43.6 g Trizma base, 14.8 g acetato de sodio, 6.7 g EDTA 0.5M, para 1 litro), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C, se agregó 10 µl de bromuro de etidio. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, evitando dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó 3 µl de azul de bromofenol, se colocaron 10 µl del ADN, se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se agregó un volumen de buffer TBE 0.5x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90-95 volts por 45 minutos mediante una fuente de poder de 200 volts. Se visualizó la banda correspondiente al ADN de cada muestra mediante un fotodocumentador.



Figura 6: Agarosa al 1% vertiéndose en un portagel.

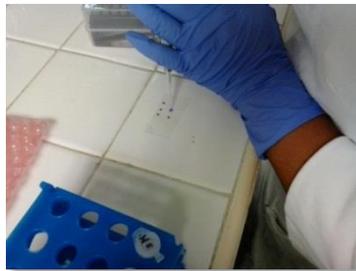


Figura 7: Tira de parafilm con azul de bromofenol más muestra.

7.8.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez que se obtuvo buena cantidad y calidad del ADN de cada muestra, se llevó a cabo amplificación del gen 18S ADNr empleando los iniciadores PN3 (5'-CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC -3') y PN10 (5'-TCCGCTTATTGATATGCTTAAG -3').

Se etiquetaron microtubos de 0.2 ml para las muestras. Se sacaron las muestras y reactivos del refrigerador y congelador, se colocaron en baño de hielo 8 minutos para que se descongelaran gradualmente. Después se sometieron a un pequeño paso de homogenización (vortex por 5 segundos). Se realizó el coctel colocando en un tubo de 0.6 ml los reactivos que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Composición del coctel empleado para la reacción en cadena de la polimerasa.

Reactivos	Cantidad (para 1 muestra)
Agua destilada desionizada estéril	18 μ l
Buffer para PCR 10x	2.5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 μ l
dNTPS (25 mM)	0.2 μ l
Iniciador 5'-3' (15 pM)	0.83 μ l
Iniciador 3'-5' (15 pM)	0.83 μ l
Enzima Taq-Polimerasa (5 U/ml)	0.2 μ l
TOTAL	24 μ l

Se mezclaron los reactivos con la micropipeta, el tubo se depositó en un recipiente con hielo. Posteriormente se depositaron 24 μ l del coctel en un tubo de 0.2 μ l, luego se adicionó 1 μ l del ADN de la muestra y se mezclaron con la micropipeta. Los tubos se introdujeron al Termociclador marca Labnet, donde las condiciones de PCR fueron las siguientes: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos (30 segundos a 95°C, 30 segundos de la TM del iniciador, 1 minuto a 72°C) y 10 minutos a 72°C. Una vez terminado el tiempo de corrida las muestras se guardaron a -20°C en el congelador.



Figura 8: Termociclador

Una vez obtenido el producto de la PCR, se realizó una electroforesis horizontal para verificar la presencia del amplificado de cada muestra, y comprobar con un marcador molecular el amplificado de 600 pares de bases de cada banda.

7.8.4 Electroforesis horizontal de agarosa al 3%

En un vaso de precipitado se disolvieron 1.5 g de agarosa en 150 ml de buffer TAE 0.5x (Trizma base, ácido bórico, EDTA 0.5M), mediante una parrilla de calentamiento (300°C) hasta que la mezcla se tornó transparente. Se dejó enfriar la agarosa hasta una temperatura de 45°C, se agregó 10 µl de bromuro de etidio. La solución se vertió en un portagel al cual se le agregó un peine, evitando dejar burbujas en el gel. Se dejó solidificar el gel de 15 a 20 minutos y se removió el peine. Sobre una tira de parafilm se colocó (3 µl) azul de bromofenol, se colocaron 10 µl del ADN, se mezcló succionando y expulsando de 5 a 10 veces. La mezcla se colocó en un pozo del gel, se colocó en la cámara de electroforesis y se agregó un volumen de buffer TBE 0.5x hasta cubrir completamente el gel. Las muestras se fraccionaron a 90-95 volts por 45 minutos. En el Transiluminador de luz UV, se visualizó la banda correspondiente a cada gen.

Los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar a la empresa Macrogen USA. Para la secuenciación del amplificado se utilizaron los iniciadores 518F (CCAGCAGCCGCGGTAATACG) y 800R (TACCAGGGTATCTAATCC).

La búsqueda de homología de secuencias se llevó a cabo empleando la herramienta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) de la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Análisis proximal del residuo

En la Tabla 8, se presentan los resultados de la caracterización de la cascara de granada deshidratada. La importancia del análisis proximal del residuo radica en el conocimiento del material como fuente de energía y proteínas, para poder llevar a cabo el proceso de fermentación por un microorganismo.

Tabla 8: Contenido Físico-Químico de cascara de granada.

Parámetro	Media
Materia seca total %	92.10 ± 0.014
Humedad %	7.90 ± 0.014
Ceniza %	2.45 ± 0.0022
Grasa %	0.62 ± 0.004
Proteína %	15.24 ± 0.32
Fibra cruda %	67.16 ± 0.014

*Los resultados del análisis son representados como el promedio de tres repeticiones de la muestra

Los resultados obtenidos en nuestra caracterización, concuerda con la de otros trabajos realizados, (Castillo-Sánchez, 2010; De la Cruz et al., 2013; Buenrostro, et al., 2017), nuestros resultados se mantienen dentro de rango, en excepción de la proteína y fibra cruda, estos se encuentran por encima. Nuestro resultado nos indica que el polvo de cascara de granada, muestra que es un residuo con buenas características para ser utilizado como sustrato en la fermentación en medio líquido, atribuyendo todos los nutrientes necesarios para que el microorganismo realice una adecuada función.

El resultado de ceniza es de 2.45%, esto es similar a lo que ha reportado los autores mencionados con anterioridad. En nuestra materia están presentes los minerales, que son elementos inorgánicos y muchos de ellos son fundamentales para la actividad del microorganismo en la fermentación.

El resultado de proteína es de 15.24%, (Aguilar, et al., 2008) reporta 6.10% de proteína después de fermentación a 96h, nuestro resultado se encuentra por arriba del resultado del autor citado, encontrando un alto contenido de proteína. Este porcentaje nos indica el contenido de nitrógeno, el microorganismo le sirve para realizar sus funciones llevando a cabo su proceso de fermentación. Este nutriente

es indispensable para realizar la actividad del microorganismo así generando más células y produciendo compuestos. Si la cáscara de granada presenta baja cantidad de nitrógeno, la muestra estará deficiente y no se llevará adecuadamente el proceso de fermentación. Es muy importante tener presente un alto contenido de proteína porque es indispensable llevar una actividad adecuada del microorganismo.

El valor que se obtuvo para la fibra cruda fue de 67.16%, un valor alto en cáscara de granada, de acuerdo con De la Cruz, et al., (2013) reporta 17.75%, encontrando por arriba nuestro resultado, la fibra se encuentra presente en la muestra con un contenido adecuado para realizar su función. La fibra nos representa la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina, estos carbohidratos presentan alto peso molecular atribuyendo una gran cantidad de compuestos fenólicos, por ello la cascara de granada representa una excelente fuente para obtener sustancias fenólicas de alto valor agregado.

Se ha reportado que los compuestos asociados a la fibra de cáscara de granada corresponden a taninos hidrolizables como punicalagina, punicalina, pedunculagina, entre otros compuestos fenólicos como ácido elágico, ácido gálico, rutina y quercetina (Middha y col., 2013). Los taninos hidrolizables han atraído gran interés debido a sus propiedades anticancerígenas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, etc. (Althunibat y col., 2010; Larrosa y col., 2010).

8.2 Cinética de degradación de compuestos fenólicos

En esta etapa, se probaron, obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 9, los residuos como fuente de carbono para la degradación de los fenoles hidrolizables.

Tabla 9: Composición química del extracto de cascara de granada antes y después de la fermentación.

Parámetro	Media	
	Inicial (g/L)	Final 240 h (g/L)
Azúcares Totales %	0.90 ± 0.02	1.37 ± 0.16
Azúcares Reductores %	5.19 ± 0.01	6.24 ± 0.85
Fenoles Hidrolizables Totales %	4.19 ± 1.05	66.29 ± 31.18

8.2.1 Cuantificación de Azúcares Totales

En la Figura 9 se observa la curva patrón, construida para cuantificar los azúcares totales y en la siguiente figura 10 el resultado, realizando diluciones para su lectura y luego multiplicados por su factor de dilución. Estos resultados indican que la concentración de azúcares totales que se encuentra en la cáscara de granada, tiene una concentración baja.

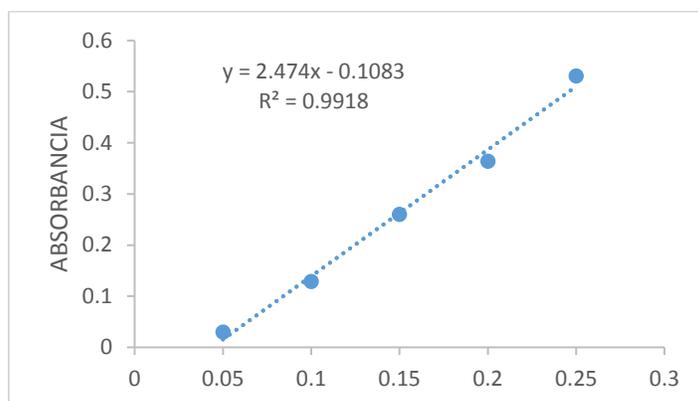


Figura 9: Curva para cuantificar los azúcares totales.

Las primeras fuentes de sustrato disponible en el medio de cultivo son los azúcares disueltos, provenientes del extracto de granada, (Favadi y col. 2005) mencionan que azúcares como glucosa y fructosa en granada son de fácil asimilación por el microorganismo.

En la figura 10 se muestra la producción de los azúcares totales, se observó que al inicio de la fermentación se obtuvo una concentración inicial de 1.07 mg/ml. El incremento a la producción fue subiendo a los 24 h, en las siguientes horas es notorio que la producción se mantiene inestable, a partir del tiempo 96 h el consumo de los azúcares tuvo un incremento notable, en el tiempo 168h se observó una caída ligera, sin embargo, la producción de los azúcares totales se mantuvo en incremento hasta en el tiempo 240 h, no teniendo una producción total en esta gráfica.

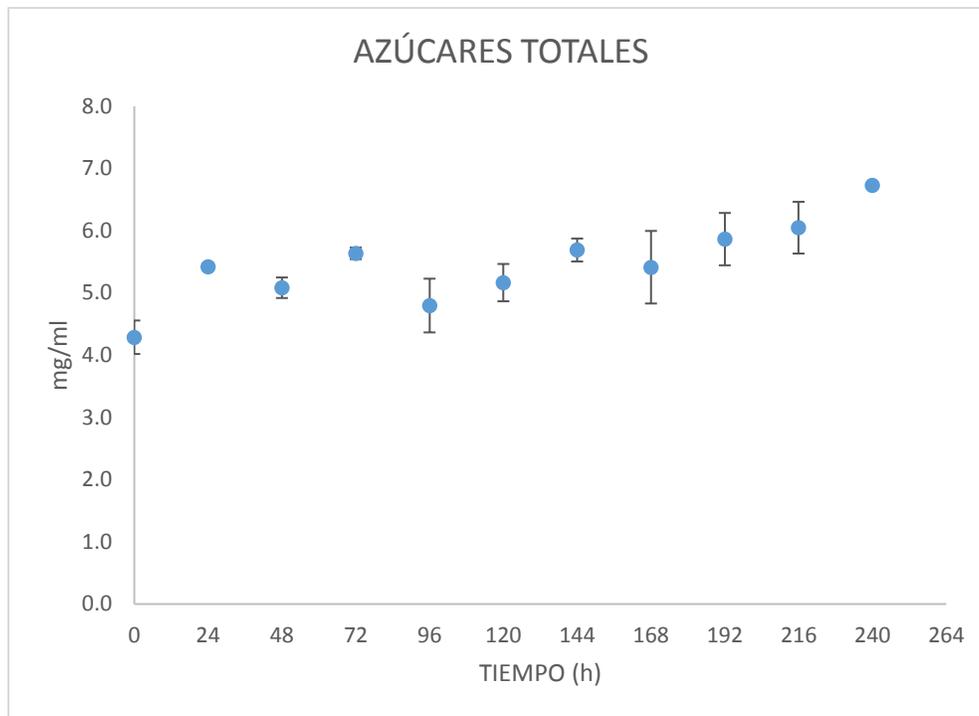


Figura 10: Cinética de azúcares totales

El resultado obtenido en este trabajo fue de 0.90% inicial y 1.39% final, por lo que este trabajo está por debajo de lo reportado por (Cervantes, 2016), con un contenido de azúcares totales de 4.756% en jugo de granada variedad *wonderful*, jugo fresco.

El cultivo tuvo un incremento de masa de azúcares totales, demostrando la capacidad de la cepa para producir azúcares totales, el microorganismo es capaz de producir azúcares totales en cantidad mínima.

El aumento de los azúcares está asociada a las necesidades metabólicas del microorganismo, principalmente para la obtención de energía para su incremento. El consumo de azúcares totales se puede deber a que la cascara de granada no solamente contiene azúcares, también contiene compuestos fenólicos en los cuales pueden ser usados como fuente de carbono.

8.2.2 Cuantificación de Azúcares Reductores

Estos resultados indican que la concentración de azúcares reductores que se encuentra en la cascara de granada, calculada a partir de la curva de calibración presentada en la figura 11.

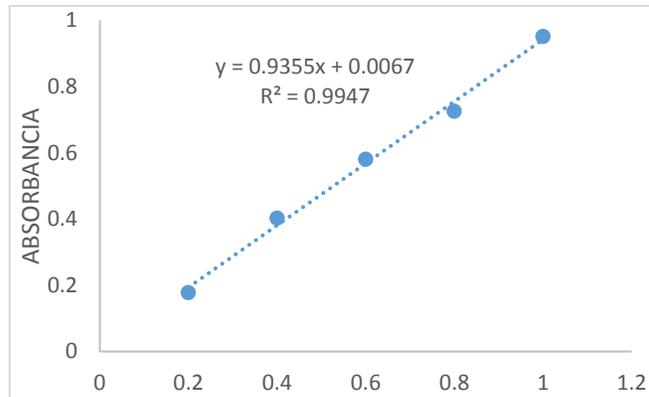


Figura 11: Curva para cuantificar los azúcares reductores.

Se muestra en la figura 12, el resultado obtenido de la fermentación de cáscara de granada utilizando el extracto de ello para determinar su composición.

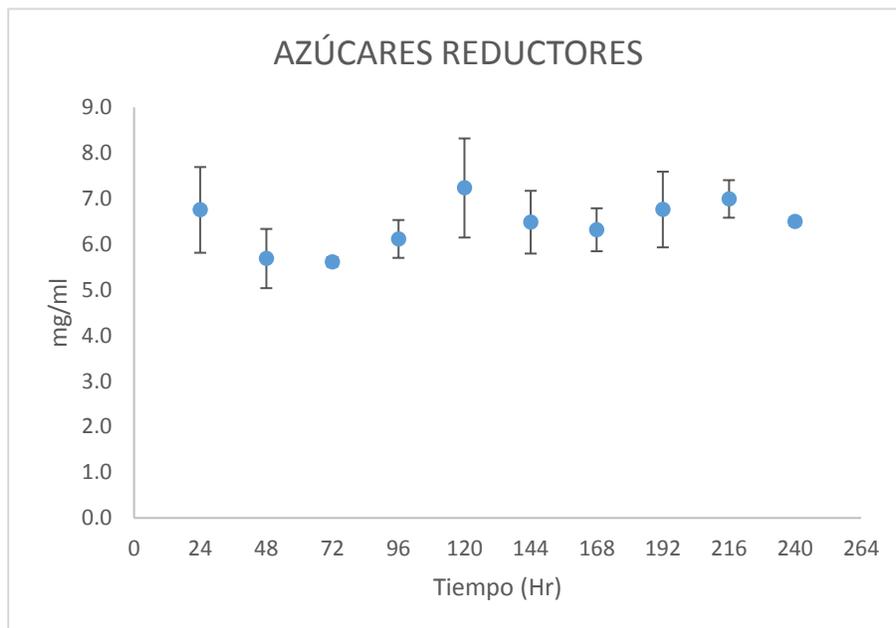


Figura 12: Cinética de azúcares reductores

En la Figura 12 se muestra la producción de azúcares reductores, se observa que en el inicio de la fermentación se obtuvo una concentración inicial de 4.15 mg/ml. el incremento a la producción fue muy notable a los 24 h, a partir de este tiempo se puede ver la gráfica que no presenta una estabilidad en ello, terminando con una

producción de 6.50mg/ml en 240 h, pero si se observa un crecimiento moderado, indicando que la cascara de granada presenta azúcares reductores y que el hongo es capaz de producir azúcares reductores en pequeñas cantidades.

La granada presentó una concentración de azúcares reductores de 5.19% inicial y 6.24% final aplicada la fermentación. Existen resultados que reportan un contenido de azúcares reductores de 13.02 g/100ml en jugo de granada para diferentes variedades (Carreño et al., 2015). Comparando el contenido de azúcares reductores obtenido en esta investigación, se observa que el material evaluado tiene una diferencia significativa. Así mismo (Cruz et al., 2013) mencionan que la cascara de la granada posee un 4.34 % de azúcares reductores, quedando este valor más próximo a lo encontrado en este estudio.

8.2.3 Cuantificación de Fenoles Hidrolizables Totales

En la Figura 13 se presenta la curva de calibración que se utilizó para la cuantificación de compuestos presentes en los extractos de la muestra, tomando como referencia ácido gálico.

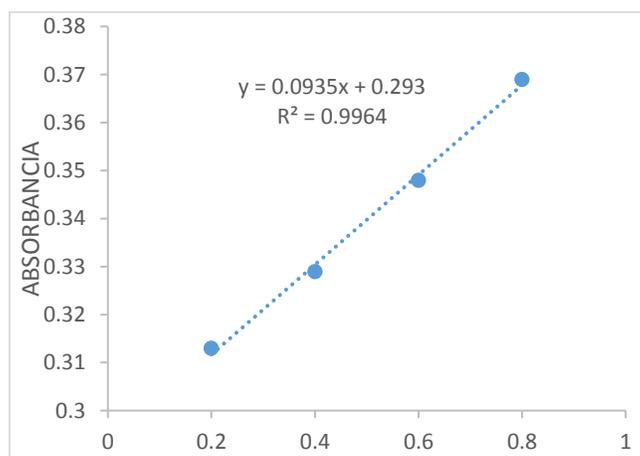


Figura 13: Curva de calibración de ácido gálico para determinación de fenoles hidrolizables totales.

La cáscara de granada es un buen soporte, y al mismo tiempo un sustrato excelente en la producción de metabolitos de alto interés comercial como EA debido a la degradación de su contenido ET. Robledo, 2008.

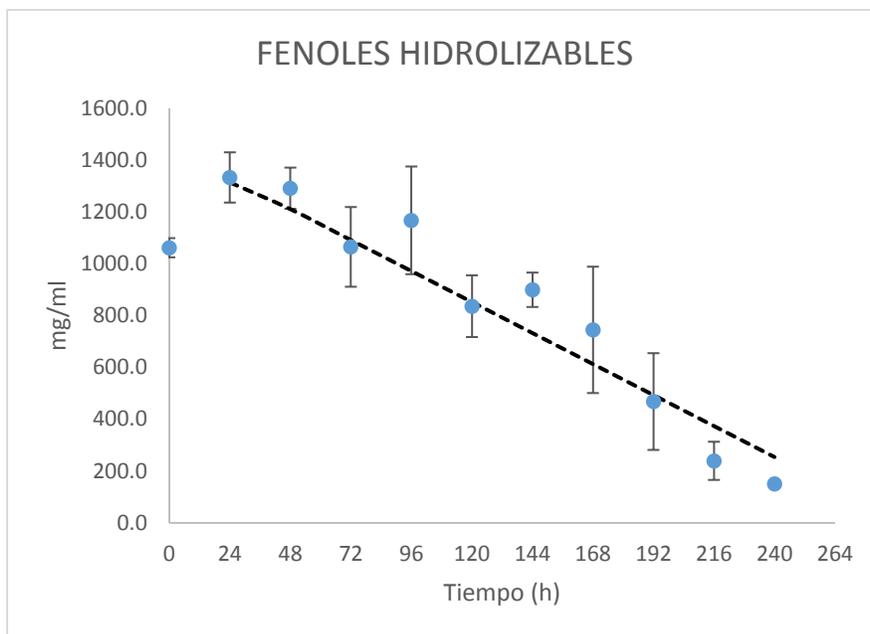


Figura 14: Cinética de fenoles hidrolizables totales

Los polifenoles hidrolizables en algunos casos son empleados como fuente de carbono y energía por los microorganismos, en este caso la cepa tiene la capacidad de crecer en concentraciones altas de estos compuestos.

En la figura 14 se muestra el consumo de polifenoles en función del tiempo, se observa un consumo inicial de polifenoles totales 82.45 mg/ml, en el tiempo 0h- 48h se observa un crecimiento de producción de fenoles, siendo el máximo en 48 h, después se observa que hay un decrecimiento muy significativo debido al consumo de los mismos en forma constante y observando una tasa de consumo muy significativo y finalizando con un consumo de 12.05 mg/ml. Esto muestra que el microorganismo fue capaz de degradar los polifenoles presentes en el extracto.

En el cuadro se muestra el contenido de fenol hidrolizable en la cascara de granada fue de 66.29%. Sin embargo, (Singh, et al., 2014 y Gutiérrez, 2015) nos reporta el contenido de fenoles totales de (255.98 mg EAG/g y 249.41 mg/g) respectivamente. Como se observa, el contenido de polifenoles en este trabajo está por debajo del rango. (Ozgen et al., 2008) reporta un rango de concentraciones de polifenoles de 124.5 – 207.6 mg AG/ml para jugo fresco de arilos de granada.

Por lo tanto, el contenido de polifenoles aumenta ya que la cascara de granada posee una concentración de polifenoles diez veces más alta que la pulpa de granada (Cam et al., 2010).

El consumo de fenoles hidrolizables totales se debe a que los polifenoles de mayor peso molecular son degradados a moléculas de menor tamaño (monómero o dímero). Los polifenoles hidrolizables de cascara de granada reportados en la literatura son los elagitaninos, tales como punicalagin, punicalin, ácido galaelagico y glicosidos de ácido elágico (El-Toumy & Rauwalda 2002).

8.3 Biomasa

El resultado de la determinación de la producción de biomasa se realizó sometándolo a una incubadora durante 48 h hasta obtener un peso constante, figura 15.

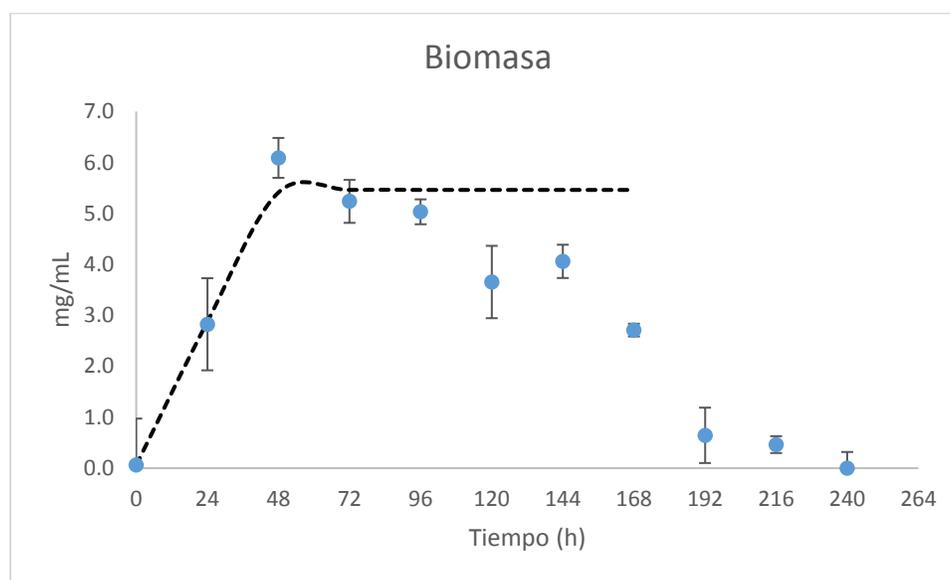


Figura 15: Cinética de biomasa

En la gráfica de la figura 15, se observa una tendencia de curvas de crecimiento de microorganismos donde no presenta una fase latente, se observa claramente que la gráfica presenta una fase exponencial produciendo un incremento de números de microorganismos a partir de 0-48 h, en que 48h está relacionado con el consumo máximo de sustrato, principalmente a los polifenoles. Después del tiempo 48h – 96 h presenta una pequeña fase estacionaria, donde los nutrientes se agotan. En el tiempo 96 h-240h se aprecia perfectamente la fase de muerte donde se caracteriza la disminución de números de microorganismos por la falta de sustrato que estos necesitan. La cascara de granada es un excelente residuo orgánico para utilizarse como sustrato/ soporte en proceso de FML.

(Sepúlveda, et al., 2012) reporta un crecimiento fúngico, mostrando una fase de latencia de casi 40 h, que es el período de tiempo necesario para biosintetizar enzimas y consumir nutrientes fácilmente absorbibles presentes en las cáscaras de granada. Después de 40 h, la biomasa se forma constantemente durante el tiempo de incubación restante hasta 72 h.

A comparación con los resultados, en nuestro trabajo la fase exponencial se presenta en tiempo 0-48hr, mientras que el del autor se presenta a partir del tiempo 40h, donde estos trabajos coinciden en un tiempo de 8 h en la fase exponencial, donde los microorganismos se reproducen al máximo por el sustrato presente.

8.4 Modelamiento del proceso de degradación de compuestos fenólicos.

La cinética de crecimiento se muestra en Figura 15, donde se puede observar que la máxima tasa de crecimiento se alcanza a las 48 horas de fermentación. Los valores de biomasa obtenidos se ajustaron mediante la ecuación logística, para obtener los parámetros cinéticos de X_0 , X_{max} y μ_{max} (Tabla 10).

El hongo fue capaz de consumir favorablemente los azúcares presentes en la matriz compleja (Figura 14). El mayor consumo se genera a los 10 días de fermentación, con una velocidad de consumo de 0.1047 mg de FHT/L de medio por día, lo que se ve reflejado en el crecimiento micelial.

Tabla 10: Parámetros cinéticos asociados al crecimiento del microorganismo empleando residuos de granada como sustrato.

Parámetro	Unidades	
X_0	0.06	mg/mL
μ_{max}	0.19	1/h
X_{max}	5.46	mg/mL

8.5 Identificación molecular del microorganismo utilizado.

Se extrajo ADN de una cepa de hongo filamentoso productora de la enzima celulasa extrayendo la biomasa de una fermentación en medio Czapek, pero utilizando como fuente de carbono glucosa al 30% para poder obtener mayor cantidad de biomasa en menos tiempo.

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar el método de espectrofotometría

(Carranza D. 2006) que fue el método que empleamos para cuantificación del ADN obteniéndose los siguientes resultados que se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Valores obtenidos en la cuantificación de ADN por espectrofotometría

Muestra	λ 260	λ 280	R	$\mu\text{g/ml}$	μg totales (50 μl)
M4	0.088	0.039	2.256	440	22

8.5.1 Calidad del ADN

Tomando en cuenta los datos de tabla anterior, se procedió a realizar la Tabla 12, facilitando de esta manera hacer de nuestro conocimiento las cantidades adecuadas de reactivos y muestra requerida y efectuar la electroforesis.

Tabla 12: Calidad del ADN

Muestra	μl Bromuro de Etidio	μl Azul de Bromofenol	μl Muestra ADN
M4	10	3	10

Se evaluó la calidad del ADN por medio de una electroforesis, la cual fue buena ya que aparecieron bandas definidas en la parte superior del gel (Figura 16). Mientras que el material parcialmente degradado forma un barrido (mancha) de fragmentos pequeños a lo largo del carril (Valadez, 2000).



Figura 16: Electroforesis con gel agarosa al 1%. Calidad del ADN, Carril: 1, cepa M4.

La cepa M4 observa una banda perceptible es posible debido a una buena presencia de cantidad de ADN.

Una vez teniendo ADN de buena cantidad y calidad, se realizó las PCR específica para el gen 18 S ARNr. La identificación por PCR ha sido el método más utilizado por su rapidez, reproductibilidad es una técnica muy sencilla y necesita cantidades de ADN muy pequeñas (Sambrook y Russell, 2001).

Una de las razones más comunes para el uso de la PCR es la formación de suficiente ADN para su secuenciación (Carranza D. 2006) que fue el fin en esta investigación ya que el producto de la PCR se envió a secuenciar para la identificación de la cepa.

9 CONCLUSIONES

En análisis proximal de los residuos de granada, nos permiten obtener información sobre los compuestos presentes en el material y que pueden ser utilizados dentro de una fermentación por microorganismos. Estos datos permitieron ajustar de una manera óptima la adición de minerales, para llevar un mejor proceso fermentativo.

La granada (*Punica granatum* L.) es una fruta rica en componentes fenólicos, principalmente del tipo de taninos hidrolizables.

El microorganismo aislado de la manzana pudo degradar favorablemente los fenoles hidrolizables y mantener la liberación de azúcares fermentables de manera continua durante todo el proceso fermentativo.

La ecuación logística nos permitió modelar el crecimiento del hongo en las primeras etapas de crecimiento, donde se identificó una pronta adaptación del microorganismo a la fuente de carbono y nitrógeno.

Aunque la identificación del hongo no se ha concluido, si se pudo extraer ADN de buena calidad y cantidad para poder amplificar y secuenciar el gen 18S ARNr.

10 BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, C.N., Aguilera-Carbó, A., Robledo, A., Ventura, J., Belmares, R., Martínez D., Rodrigo-Herrera, R. & Contreras, J. (2008). Production of antioxidant nutraceuticals by Solid-State Cultures of Pomegranate (*Púnica granatum*) Peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Leaves. *Food technol. Biotechnol.* 46 (2) 218-222.

Althunibat, O. Y., Al-Mustafa, A. H., Tarawneh, K., Khleifat, K. M., Ridzwan, B. H. y Qaralleh, H. N. 2010. Protective role of *Punica granatum* L. peel extract against oxidative damage in experimental diabetic rats. *Process Biochem.*, 45(4), 581-585.

Buenrostro-Figueroa, J.J., Sepúlveda, L., Aguilar, C. N., Prado, L. A. (2017). Cascara de granada como soporte para la producción de pectinasas. Departamento de biotecnología. Universidad autónoma metropolitana.

Çam M. y Hisil Y. (2010). Pressurised water extraction of polyphenols from pomegranate peels. *Food Chemistry*, Vol. 123, 878-885.

Cardoso C.L, Silva H.S, Castro-Gamboa Ian. Bolzani V.S. (2005). New Biflavonoid and Other Flavonoids from the Leaves of *Chimarrhis Turbinata* and their Antioxidant Activity. *Jornal of Brazilian Chemical Society* vol.16: 1353-1359.

Carranza D. Z. (2006). Tesis licenciatura. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Agropecuarias. Pp. 32-33

Carreño-Raga J., Pérez-Mármol Z., Pérez E., Paéz G. & Araujo, K. (2015). Evaluación fisicoquímica y fitoquímica de granada (*Punica granatum*L.). *Revista Tecnocientífica URU*. Universidad Rafael Urdaneta. Facultad de Ingeniería. (47-55).

Castillo-Sanchez T.,(2010). Extracción y cuantificación de aceites esenciales de cascara de granada (*punica granatum* L.) y determinar su efecto antifúngico sobre *penicillium* sp. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Cervantes- Hernández, I. (2016). Efecto de Pulsos eléctricos moderados sobre el jugo de granada. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma Garria Antonio Narro.

Cruz Martínez L.C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Pontificia universidad javeriana, facultad de ciencias. P. 34.

De la cruz, et al., (2013). La granada fuente de potentes agentes bioactivos. Article.,CienciAcierta. Universidad Autónoma de Coahuila. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.Universidad Autónoma Metropolitana.

Díaz-Mena A. G., Guzmán-Maldonado S. H; (2014). Calidad nutraceutica de extractos de granada dulce y acida y bioaccesibilidad de sus componentes fenólicos en un modelo in vivo. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de química. Pág. 1.

Dorman H.J.D, Hiltunen R. (2004). Fe III reductive and free radical scavenging properties of summer savory (*Satureja Hortensis L.*) Extract and subfractions. Food chemistry; 88: 193-199.

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

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.

Gutiérrez-Pacheco, S.L (2015). Calidad y capacidad antioxidante de salchichas de cerdo adicionadas con jugo y cascara de granada (*Púnica granatum L.*). Tesis Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

Hernández H. C. (2015). Extracción y cuantificación de compuestos fenólicos en cascara de rambután (*Nephelium Lappaceum*) para la implementación en la industria alimentaria como una infusión (bebida funcional). Tesis licenciatura. Universidad autónoma agraria Antonio narro.

Larrosa, M., González-Sarrías, A., Yáñez-Gascón, M. J., Selma, M. V., Azorín Ortuño, M., Toti, S., Tomás-Barberán, F., Dolara, P. y Espín, J. C. 2010. Anti inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. The Jornal of Nutritional Biochemistry, 21(8), 717- 725.

López-Mejía O. A., López-Malo A. & Paulo, E. (2010). Granada (*Púnica Granatum L.*): una fuente de antioxidantes de interés actual. Universidad de las Américas, Puebla. Temas selectos de ingeniería de alimentos 4-1: 64-73.

Martinez-Valverde, I., Periago, M. J. & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos de la dieta. ResearchGate. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 50 n°1.

Marwah R.G., Fatope M.O., Mahrooqi R.A., Varma G.B., Abadi H.A., Khamis S., Burtamani-Al. (2007). Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in oman. Food chemistry; 101: 465-470.

Middha, S. K., Usha, T. y Pande, V. 2013. HPLC Evaluation of Phenolic Profile, Nutritive Content, and Antioxidant Capacity of Extracts Obtained from Punica granatum Fruit Peel. Advances in Pharmacological Sciences, 2013, 6.

Ozgen M., Durgaç C., Serçe S. y Kaya C. Chemical and antioxidant properties of pomegranate cultivars grown in the Mediterranean region of Turkey. Food Chemistry, Vol. 111, (2008), 703-706.

Porrás-Loaiza, A. P. & López-Malo, A. (2009). Importancia de los grupos fenolicos en los alimentos. Temas selectos de ingeniería de alimentos 3-1: 121-134.

Posada-Jaramillo, M., Pineda-Salinas, V & Agudelo-Ochoa, G. M. (2003). Los antioxidantes de los alimentos y su relación con las enfermedades crónicas.

Pretell-Vasquez, C., Marquez-Villacorta, L. & Siche, R. (2016). Efecto del ozono gaseoso sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas y apariencia general de púnica granatum L. wonderful fresca. Universidad nacional deTrujillo. Scientia agropecuaria 7 (3) 173-180.

Proteggente, A. R.,Pannala, A. S., Paganga G., Van Buren L.,Wagner E.,Wiseman, S.,Van de Put F., Dacombe C. and Rice-Evans, C.A. 2002. The oxidants activity of a regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. Free radicals Research 36 (2): 217-233.

Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Jornal of Clinic Interventions in Again. 2007 june; 2(2): 219-36.

Robledo, A., Aguilera-Carbo, A., Rodriguez, R., Martinez, J. L., Garza. Y. & Aguilar, C. N. 2008. Ellagic acid production by aspergillus niger in solid state fermentation of pomegranate residues. I ind microbiol biotechnol. 35:507-513.

Sambrook K. J. y Russell D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Volumen I, II Y III. 3ed. Cold spring harbor laboratory press, New York. 2400pp. Smith john E. Biotecnología (2006). Ed.ACRIBIA, S.A.

Santos Orozco L. (2014). Tesis Licenciatura. Aislamiento de hongos filamentosos con propiedades de producción de la enzima celulasa. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Pp. 6-10,25-30.

Santos-Buelga, C. & Tomás-Barberán, F. A. (2001). Grupos que componen los polifenoles. <http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/108217-Sustancias-fitoquimicas-de-frutas-y-hortalizas-su-posible-papel-beneficioso-para-la-salud.html>. (05/11/2017). 08:27 pm.

Sepúlveda, J., Aguilera-Carbó, A., Ascacio-Valdes, J.A., Rodriguez-Herrera, R., Martinez-Hernandez, J.L., Aguilar, C.N. (2012). Optimization of ellagic acid accumulation by *aspergillus niger* GH1 in solid state culture using pomegranate shell powder as a support. *Process Biochemistry* 47 (2012) 2199–2203.

Singh, s. & Immanuel, g. (2014). Extraction of antioxidants from fruit peles and its utilization in panner. *Food process technol.* 5:7

Taipe, J. 2012 El cultivo del Granado Experiencia Peruana. Agrícola Wambra SAC.

Vásquez-Castillo, F., (2015). Elaboración de néctar de granada (*púnica granatum* L.) variedad wonderful con camu (*myrciaria dubia*) y esteviósido. Universidad le Cordon Bleu. Escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

Vergara- Gómez, S. (2014). Estrategias tecnológicas para optimizar la producción y la vida útil de zumo de granada (*Punica granatum* cv. Mollar). Tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández de Elche. Instituto de biología molecular y celular. Pp. 11-22

Wengenack N, Binnicker M. 2009. Fungal molecular diagnostics. *Clin. Chest. Med.* 30: 391–408.