



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Análisis comparativo de la actividad enzimática de levaduras no-convencionales para la producción de ácido elágico a partir de frutillas

Tesis presentada por:

Anahí Márquez López

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería Química
como requisito parcial para obtener el Grado de:**

DOCTORA EN CIENCIAS
EN
INGENIERÍA QUÍMICA

Directora de Tesis: D. en C. Ma. Del Carmen Chávez Parga

Co - Director: D. C. Juan Carlos González Hernández

Morelia, Michoacán. Mayo 2020.

Resumen

Análisis comparativo de la actividad enzimática de levaduras no convencionales para la producción de ácido elágico a partir de frutillas

Por

Anahí Márquez López

Mayo 2020

Doctora en Ciencias en Ingeniería Química

Directora de Tesis: D. en C. Ma. Del Carmen Chávez Parga

Co - Director: D. C. Juan Carlos González Hernández

El ácido elágico es un compuesto polifenólico obtenido por la degradación de elagitaninos presentes en diversos frutos y plantas, el cual tiene una gran cantidad de aplicaciones en diversas áreas como lo son la nutracéutica, la farmacéutica, la industria cosmética y alimenticia (Vázquez-Flores *et al.*, 2012). Se ha realizado una gran cantidad de investigaciones para la producción de ácido elágico donde se han utilizado como organismos productores de enzimas tanasa (EC 3.1.1.20) y β -glucosidasa (EC 3.2.1.21), (Ramírez-Conejo, *et al.*, en revisión), diversas cepas de hongos filamentosos del género *Aspergillus*, así como, diferentes fuentes vegetales ricas en elagitaninos, sin embargo, la utilización de hongos conlleva un aumento en la cantidad de sustrato requerido para su crecimiento, así como también demanda mayor tiempo para la fermentación lo que repercute a su vez en los costos de energía, por lo tanto, se investigó el desarrollo de alternativas para mejorar dicho proceso, utilizando levaduras no-convencionales, como microorganismos productores de las enzimas de interés, reduciendo tiempo de fermentación y costos de mantenimiento y adaptación de los microorganismos. La forma de obtener el ácido elágico es mediante la hidrólisis de los enlaces éster que unen a la molécula de ácido hexahidroxi-difénico (HHDP) con la molécula de glucosa (elagitaninos), para después sufrir una lactonización espontánea de la molécula de HHDP, para obtener el producto de interés. En esta investigación se realizó el estudio de frutillas, el caso particular de fresa y zarzamora, endémicas del Estado de Michoacán, las cuales figuran entre los frutos con altos niveles de elagitaninos, se determinó la presencia de las enzimas tanasa y β -glucosidasa en levaduras no-convencionales, y se llevó a cabo la fermentación en cultivos mixtos y puros para la obtención de ácido elágico. Concluyendo que

las levaduras no-convencionales en cultivo mixto utilizando la fresa como fuentes de elagitaninos son una opción viable para la producción de ácido elágico.

Palabras clave: ácido elágico, levaduras no-convencionales, elagitaninos, fresa, zarzamora.

Abstract

Comparative analysis of the enzymatic activity of unconventional yeasts to produce ellagic acid from small berries.

By

Anahí Márquez López

May 2020

Doctor of Science in Chemical Engineering

Thesis Consultant: D. en C. Ma. Del Carmen Chávez Parga

Co - Consultant: D. C. Juan Carlos González Hernández

Ellagic acid is a polyphenolic compound obtained by the degradation of ellagitannins present in various fruits and plants, which has many applications in various areas such as nutraceuticals, pharmaceuticals, the cosmetic and food industry (Vázquez-Flores et al., 2012). A large number of investigations have been carried out for the production of ellagic acid where tannase enzymes (EC 3.1.1.20) and β -glucosidase (EC 3.2.1.21) have been used as organisms (Ramirez-Conejo, et al., in review), various strains of filamentous fungi of the genus *Aspergillus*, as well as, different vegetable sources rich in ellagitannins, however, the use of fungi entails an increase in the amount of substrate required for its growth and also demands more time for fermentation which impacts in turn on the energy costs, therefore, the development of alternatives to improve said process was investigated, using unconventional yeasts, as microorganisms producing enzymes of interest, reducing fermentation time and maintenance and adaptation costs of microorganisms. The way to obtain ellagic acid is by hydrolysis of the ester bonds that bind the hexahydroxydiphenic acid molecule (HHDP) with the glucose molecule (ellagitannins), to then undergo spontaneous lactonization of the HHDP molecule, to obtain product of interest. In this investigation, the study of small berries was carried out, in particular the case of strawberry and blackberry, endemic to the State of Michoacán, which are among the fruits with high levels of ellagitannins, the presence of the enzymes tannase and β -glucosidase in unconventional yeasts was determined, and fermentation was carried out in mixed and pure cultures to obtain ellagic acid.

Keywords: ellagic acid, unconventional yeasts, ellagitannins, strawberry, blackberry.

Agradecimientos

Agradezco el apoyo social y académico de mis directores de Tesis la Doctora Ma. del Carmen Chávez Parga y el Doctor Juan Carlos González Hernández, a quienes en estos cuatro años me apoyaron y me mostraron que ser asesor va más allá de acciones y consejos académicos.

A la mesa tutorial conformada por el Doctor Horacio González Rodríguez, Doctor Rafael Maya Yescas gracias por estar al pendiente y estar presentes en cada uno de mis avances dándome propuestas sobre el proyecto y ánimos para continuar, así como al Doctor Jaime Espino Valencia por sumarse al proyecto.

Agradezco a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, así como a mi alma máter el Instituto Tecnológico de Morelia por abrirme sus puertas, especialmente al Laboratorio de Bioquímica liderado por el Doctor Juan Carlos González Hernández, el cual me dio todas las facilidades para llevar a cabo mi investigación, siempre estando al tanto de reactivos, equipos y apoyo físico y académico.

A los alumnos de la carrera de Ingeniería Bioquímica que participaron en la investigación y que sin su apoyo todo esto no hubiera sido posible: IBQ. Stalishnaya Macías Pureco, IBQ. Fernando Ayala Flores, IBQ. Juan David Ramírez Conejo, Kristal Ruiz Pompa, Rafael Madrigal Chávez.

Se agradecen los donativos parciales del proyecto **“Evaluación de la actividad enzimática de levaduras no-convencionales para la producción de ácido elálgico”**, de la Convocatoria de Apoyo a Proyectos de Investigación Científica, Aplicada, Desarrollo Tecnológico e Innovación 2017-2, Tecnológico Nacional de México (6268.17-P).

Por último, pero no menos importante se agradece todo el apoyo económico otorgado por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Dedicatoria

¡Hola! Las siguientes páginas contienen el resumen de cuatro años de trabajo, esta investigación fue mi compañera y fue parte de mis días y de mis noches por mucho tiempo. Detrás de estas páginas hay esfuerzo, lágrimas, risas, decepciones, alegrías, estrés, desesperación, enojo, angustia, satisfacción, esperanza, amor, en fin, muchas emociones y anécdotas que van más allá de lo que leerás a continuación, por eso te quiero agradecer que te tomes un momento de tu día para leerlo.

Te cansarás de ver tantos datos, gráficas, te darás cuenta de nuevos microorganismos y si ya los conoces sabrás que les puedes dar otro uso, también muchas veces leerás fresa y zarzamora, y tal vez la próxima vez que las veas pensarás: “Estas frutas son más interesantes de lo que parecen” y en ese momento sabré que el trabajo realizado valió la pena.

¡Espero lo disfrutes!

Para ustedes:

Yurian mi querido esposo y mi mejor amigo ¡Te amo!

Sally, Mimicha, Tommy mis ángeles en la Tierra gracias por acompañarme en esta aventura.

Glosario

Azúcares reductores: son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo intacto, y que a través de este pueden reaccionar como reductores con otras moléculas.

Biorreactor: recipiente o sistema en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos.

Crecimiento celular: es el proceso mediante el cual las células se reproducen y, de esa manera, pueden cumplir con su ciclo y funciones específicas en el organismo de los seres vivos.

Diseño de experimentos: se define como un conjunto de técnicas activas que manipulan un proceso para inducirlo a proporcionar la información que se requiere para mejorarlo mediante los cambios en sus variables y su interacción o secuencia de ejecución.

Enzima: es una molécula que se encuentra conformada principalmente por proteína que producen las células vivas, siendo su función destacada la de actuar como catalizador y regulador en los procesos químicos del organismo, es decir, cataliza las reacciones bioquímicas del metabolismo.

Hidrólisis: del griego ὕδωρ, hydōr, 'agua', y λύσις, lýsis, 'ruptura' o 'disociación', es una reacción química entre una molécula de agua y otra de macromolécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar unión de otra especie química.

Hongo filamentoso: Son hongos formados por una serie de ramas tubulares llamadas hifas, el conjunto de las cuales forman el micelio.

Levadura: Hongo unicelular que produce enzimas capaces de provocar la fermentación alcohólica de los hidratos de carbono.

Medio de cultivo: es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos.

Molécula: es un grupo de átomos, iguales o diferentes, que se mantienen juntos y no se puede separar sin afectar o destruir las propiedades de las sustancias.

No-convencional: puede referirse a lo contrario establecido por tradición y a lo que resulta poco original.

Índice

Resumen	iii
Abstract.....	iv
Agradecimientos.....	v
Dedicatoria	vi
Glosario.....	vii
Índice	viii
Lista de Tablas.....	xi
Lista de Figuras	xiii
Abreviaturas	xix
Capítulo I. Introducción	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación de la investigación.....	3
1.3 Planteamiento del problema.....	4
1.4 Hipótesis	4
1.5 Objetivo general	5
1.6 Objetos particulares	5
Capítulo II. Marco teórico.....	7
2.1 Generalidades de los polifenoles	7
2.2 Taninos.....	7
2.3 Elagitaninos como precursores del ácido elágico	9
2.4 Ácido elágico.....	12
2.5 Actividades biológicas del ácido elágico.....	13
2.6 Fuentes de obtención de elagitaninos y ácido elágico.....	16
2.7 Extracción de compuestos fotoquímicos	18
2.8 Biosíntesis de ácido elágico	19
2.9 Microorganismo con capacidad de biodegradación de elagitaninos.....	19
2.10 Levaduras no-convencionales	22
2.11 Enzimas degradativas de elagitaninos.....	23

Capítulo III. Materiales y métodos.....	27
3.1 Caracterización química de las frutillas fresa y zarzamora	27
3.2 Obtención de ácido elágico por degradación enzimática de elagitaninos.....	31
3.3 Obtención de ácido elágico a nivel biorreactor.....	36
3.4 Pruebas adicionales	38
Capítulo IV. Resultados y discusión	41
5.1 Caracterización química de las frutillas fresa y zarzamora	41
5.1.1 Análisis bromatológico	41
5.1.2 Determinación del estado de madurez	42
5.1.3 Diseño de experimentos.....	44
5.1.4 Determinación del contenido fenólico.....	45
5.1.5 Identificación de flavonoides.....	49
5.1.6 Determinación de antocianinas.....	51
5.1.7 Determinación de elagitaninos	53
5.1.8 Determinación de la actividad antioxidante	54
5.1.9 Actividad microbicida	57
5.2 Obtención de ácido elágico por degradación enzimática de elagitaninos.....	60
5.2.1 Screening de cepas de levaduras no-convencionales	60
5.2.2 Cinéticas de crecimiento de levaduras no-convencionales productoras de tanasa	62
5.2.3 pH de levaduras no-convencionales como productoras de enzima tanasa.....	64
5.2.4 Azúcares reductores cuantificados en las cinéticas de levaduras no-convencionales productoras de tanasa.....	66
5.2.5 Actividad enzimática de tanasa	67
5.2.6 Evaluación semi-cuantitativa de la actividad celulolítica	71
5.2.7 Cinéticas de crecimiento de levaduras no-convencionales productoras de β -glucosidasa.....	74
5.2.8 pH de levaduras no-convencionales como productoras de enzima β -glucosidasa	77
5.2.9 Azúcares reductores cuantificados en cinéticas de crecimiento de levaduras no-convencionales productoras de β -glucosidasa.....	78
5.2.10 Actividad enzimática de β -glucosidasa.....	79
5.3 Obtención de ácido elágico a nivel biorreactor.....	84

5.3.1 Diseño de experimentos.....	84
5.3.2 Crecimiento celular de consorcios puros y mixtos a nivel biorreactor	85
5.3.4 pH a nivel biorreactor	88
5.3.5 Azúcares reductores y determinación de la cantidad de elagitaninos	89
5.3.6 Actividades enzimáticas: tanasa y β -glucosidasa	91
5.3.7 Evaluación de la producción de ácido elágico por HPLC	93
5.3.8 Análisis estadístico.....	95
5.4 Evaluación de la interacción entre levaduras por pruebas de competencia	98
5.4.1 Pruebas exploratorias a nivel matraz	102
5.4.2 Nuevo diseño experimental	104
5.4.3 Crecimiento celular en nuevo diseño experimental	105
5.4.4 Actividades enzimáticas: tanasa y β -glucosidasa	107
5.4.5 Evaluación de la producción de ácido elágico por HPLC	109
5.4.6 Análisis estadístico.....	112
Capítulo IV Conclusiones y recomendaciones.....	114
Capítulo V. Referencias bibliográficas	116
Capítulo VI. Anexos.....	127
Artículo en preparación.....	127
Artículo en proceso de concluir.....	128
artículos publicados.....	129

Lista de Tablas

Tabla 1. Estudios realizados en la biodegradación de elagitaninos, destacando la fuente de obtención, el microorganismo utilizado y la enzima producida por cada uno.....	2
Tabla 2. Estudios utilizando levaduras no-convencionales como fuentes de enzimas como tanasa y/o β -glucosidasa.	3
Tabla 3. Alimentos ricos en elagitaninos y de importancia económica. (Tomado y modificado de Clifford y Scalbert, 2000).	16
Tabla 4. Microorganismos degradadores de elagitaninos.....	20
Tabla 5. Análisis bromatológico y determinación de minerales en Fresa y Zorzamora, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, n=3.	41
Tabla 6. Estado de madurez determinado por la técnica de acidez titulable, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, n=2.	43
Tabla 7. Diseño de experimentos factorial de dos niveles con tres factores, utilizando tres replicas en el punto central mediante el programa Statgraphics®.....	44
Tabla 8. Contenido de fenoles en Fresa y Zorzamora, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, n=13.....	45
Tabla 9. Análisis de Varianza (ANOVA) para fenoles extraídos de Fresa con solvente acetona.	47
Tabla 10. Contenido de flavonoides en Fresa y Zorzamora, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, n=13.	50
Tabla 11. Contenido total de antocianinas en Fresa y Zorzamora, los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, n=2.....	52
Tabla 12. Elagitaninos determinados en Fresa y Zorzamora frescas, los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, n=3.....	53
Tabla 13. Contenido de Vitamina C en Fresa y Zorzamora, los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, n=3.	57
Tabla 14. Actividad antimicrobiana (diámetro de la zona de inhibición, mm) de extractos con solvente acetona, etanol, metanol. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, n=3.....	58

Tabla 15. Screening de 15 levaduras sembradas en medio sólido de YPD, con concentraciones de 1%, 2% y 3% de ácido tánico. (+) para crecimiento positivo y (-) para crecimiento negativo, n=2.	60
Tabla 16. Tiempo de duplicación (t_D) y velocidad específica de crecimiento (μ) de las levaduras en medio YPD y en medios con concentraciones de ácido tánico (1%-3%). Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar, n=2.	63
Tabla 17. Tiempo de duplicación (t_D) y velocidad específica de crecimiento (μ) de las levaduras en medio con inductor glucosa, sacarosa y celulosa respectivamente. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar, n=2.	76
Tabla 18. Actividad de β -glucosidasa reportada en levaduras no-convencionales reportadas por diversas investigaciones.	83
Tabla 19. Diseño de mezclas simplex-lattice con las levaduras como variables, se consideraron 5 punto centrales y los vértices.	85
Tabla 20. Tiempo de duplicación (t_D) y velocidad específica de crecimiento (μ) de las levaduras en consorcio puro y mixto. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar, n=3.	87
Tabla 21. Resumen de las interacciones entre las cepas de levaduras no-convencionales. Los datos se presentan como el promedio (mm) \pm desviación estándar, n=2. El color rojo indica que la interacción fue negativa y el azul una interacción positiva.	98
Tabla 22. Tabla de efectos individuales sobre una levadura en particular crecimiento sobre la cepa se denoto como un efecto positivo +. Para poder determinar las combinaciones viables de levaduras, ambas deberán tener un efecto positivo +.	99
Tabla 23. Resumen de combinaciones y efectos de interacción de las levaduras no-convencionales.	101
Tabla 24. Diseño de mezclas simplex-lattice con las levaduras como variables, se consideraron 3 punto centrales y los vértices.	105
Tabla 25. Resultados de ácido elágico cuantificado por HPLC de los dos diseños experimentales utilizados en la experimentación. Los resultados son expresados como el promedio de la hora 0 a la hora 24 de cada cinética	110

Lista de Figuras

Figura 1. Clasificación de los taninos. (Tomado y modificado de Khanbabaee y Van Ree 2001).....	9
Figura 2. Hidrólisis de elagitaninos y lactonización del grupo HHDP. (Tomado y modificado de De la Cruz et al., 2011).	10
Figura 3. Biodegradación de elagitaninos, E: enzima desconocida, THA: tanino acil hidrolasa, PO: peroxidasa, PFO: polifenol oxidasa, GAD: ácido gálico descarboxilasa, PGDOX: pirogalol dioxigenasa, OHT: hiroxiltransferasa, PGDOH: pirogaloldeshidroxilasa, PGH: floroflucionol hidrolasa, MOX: monoxigenasa. (Tomado y modificado de Aguilera-Carbo et al., 2009).	11
Figura 4. Molécula de ácido elágico (Tomado y modificado de Cruz Antonio et al., 2014).	12
Figura 5. Determinación del estado de madurez, a) Fresa (g de ácido cítrico); b) Zarcamora (g de ácido málico).	42
Figura 6. Diagrama de Pareto para fenoles extraídos en Fresa con solvente acetona.	46
Figura 7. Superficies de respuesta para fenoles extraídos en Fresa, a) estado de madurez: maduro; b) Tiempo de reposo 36 horas; c) Temperatura -10.5° C.....	47
Figura 8. Superficies de respuesta para fenoles extraídos en Zarcamora, a) estado de madurez: maduro; b) Tiempo de reposo 36 horas; c) Temperatura -10.5° C.....	49
Figura 9. Cuantificación de elagitaninos en Fresa y Zarcamora frescas. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, n=3. Verde (■), Madura (■), Sobremadura (■).....	54
Figura 10. Determinación de actividad antioxidante, a) DPPH en Fresa; b) ABTS en Fresa; c) DPPH en Zarcamora; d) ABTS en Zarcamora. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, n=2. Acetona (■); Etanol (■); Metanol (■); a (Verde, 48 h, -3° C); b(Verde, 48 h, -18° C); c (Verde, 24 h, -3° C); d (Verde, 24 h, -18° C); e (Sobremadura, 48 h,	

-3° C); f (Sobremadura, 48 h, -18° C); g (Sobremadura, 24 h, -3° C); h (Sobremadura, 24 h, -18° C); i (Madura, 36h, -11° C).....	55
Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizado, a) acetona; b) etanol; c) metanol.....	56
Figura 12. Halos de inhibición obtenidos con extractos de Zorzamora contra <i>E. coli</i> , utilizando tres solventes: a) Acetona, b) Etanol y c) Metanol, y halos de inhibición obtenidos con extracto de Fresa contra <i>S. aureus</i> , utilizando tres solventes: d) Acetona, e) Etanol y f) Metanol.	59
Figura 13. Cribado para la evaluación cualitativa de tanasa en las cepas: a) <i>C. parapsilosis</i> , b) <i>P. kluyveri</i> , c) <i>C. utilis</i> , d) <i>D. hansenii</i> , e) <i>D. hansenii</i> ISA1510 f) <i>P. pastoris</i> , n = 2.....	61
Figura 14. Cinética de crecimiento celular de <i>D. hansenii</i> PYC ISA 1510, a) YPD control (—●—), b) 1% de ácido tánico (—◆—), c) 2% de ácido tánico (—■—), d) 3% de ácido tánico(—▲—).	62
Figura 15. Cambios de pH durante las fermentaciones, (a) Medio YPD, <i>P. pastoris</i> (—×—), <i>D. hansenii</i> PYC 2968 (—◆—), <i>D. hansenii</i> PYC ISA 1510 (——), <i>C. utilis</i> (—▲—), <i>P. kluyveri</i> (—■—), <i>I. terrícola</i> (—●—), <i>C. parapsilosis</i> (—◆—). (b) <i>D. hansenii</i> PYC 2968, YPD control (—●—), b) 1% de ácido tánico (—◆—), c) 2% de ácido tánico (—■—), d) 3% de ácido tánico(—▲—). ...	65
Figura 16. Consumo de azúcares reductores de las cepas: a) <i>D. hansenii</i> PYC ISA 1510 y b) <i>C. utilis</i> , YPD control (—●—), 1% de ácido tánico (—◆—), 2% de ácido tánico (—■—), 3% de ácido tánico (—▲—).	66
Figura 17. Actividad enzimática de tanasa para la levadura <i>P. pastoris</i> , a) método de metil galato; b) rodamina. YPD control (—●—), 1% de ácido tánico (—◆—), 2% de ácido tánico (—■—), 3% de ácido tánico (—▲—).	68
Figura 18. Comparación de los métodos de la actividad enzimática de tanasa determinada con: a) rodamina: 1% de ácido tánico (■), 2% de ácido tánico (■), 3% de ácido tánico (■); b) metil galato: 1% de ácido tánico (□), 2% de ácido tánico (□), 3% de ácido tánico (□).	69

Figura 19. Prueba semi-cuantitativa Rojo Congo. a) *P. pastoris*, b) *D. hansenii* ISA1510, c) *C. parapsilosis*, d) *C. utilis*, e) *P. kluyveri*, f) *I. terrícola*, g) *D. hansenii* PYC 2968.....72

Figura 20. Halo de degradación utilizando la técnica de Rojo Congo. a) *P. pastoris*, b) *D. hansenii* ISA1510, c) *C. parapsilosis*, d) *C. utilis*, e) *P. kluyveri*, f) *I. terrícola*, g) *D. hansenii* PYC 2968.....73

Figura 21. Crecimiento de las levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* (—✕—), *D. hansenii* PYCGS115 (—), *D. hansenii* ISA1510 (—◆—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—).75

Figura 22. Potencial de hidrógeno monitoreado durante las cinéticas de las levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* (—✕—), *D. hansenii* PYC 2968 (—), *D. hansenii* ISA1510 (—◆—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—).77

Figura 23. Determinación de azúcares reductores de levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* (—✕—), *D. hansenii* PYC 2968 (—), *D. hansenii* ISA1510 (—◆—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—).79

Figura 24. Determinación de actividad enzimática de levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) celulosa, b) *sacarosa*, c) glucosa. *P. pastoris* (—✕—), *D. hansenii* PYC 29685 (—), *D. hansenii* ISA1510 (—◆—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—).81

Figura 25. Crecimiento celular de un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (—▲—) y Zarzamora (—◆—). Comparado con el crecimiento microbiano de cultivos puros para Fresa *D. hansenii* PYC ISA 1510 (—◆—), y para Zarzamora *C. utilis* (—▲—).86

Figura 26. Cambios de pH durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510,

C. utilis y *P. pastoris*), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zorzamora (●). Comparado con el crecimiento microbiano de cultivos puros para Fresa *C. utilis* (◆), y para Zorzamora *C. utilis* (◆).89

Figura 27. Consumo de azúcares reductores determinados por la técnica de DNS durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zorzamora (●). Comparado con el consumo de azúcares reductores de cultivos puros para Fresa *C. utilis* (◆), y para Zorzamora *C. utilis* (◆).90

Figura 28. Consumo de elagitaninos durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zorzamora (●). Comparado con el consumo de elagitaninos de cultivos puros para Fresa *P. pastoris* (◆), y para Zorzamora *C. utilis* (◆).91

Figura 29. a) Determinación de la actividad β-glucosidasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zorzamora (●). b) Determinación de la actividad β-glucosidasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zorzamora (●). Comparado con la actividad enzimática de cultivos puros para Fresa: *P. pastoris* (◆), *D. hansenii* PYC ISA 1510 (◆), *C. utilis* (■) y para Zorzamora: *P. pastoris* (◆), *D. hansenii* PYC ISA 1510 (●), *C. utilis* (—).92

Figura 30. Producción de ácido elálgico, metabolito secundario del proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-

convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510, *C. utilis* y *P. pastoris*), utilizando como fuentes de elagitaninos Fresa y Zarcamora. Condiciones de cultivo: corrida 1 (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células) Fresa (▲); corrida 2 (1.5×10^6 de *P. pastoris*, 1.5×10^6 de *D. hansenii* PYC ISA 1510) Zarcamora (✱); corrida 11 (1.5×10^6 de *D. hansenii* PYC ISA 1510 y 1.5×10^6 *C. utilis*) Fresa (●) y Zarcamora (⊖). Comparado con la producción de ácido elálgico de cultivos puros para Fresa: *P. pastoris* (△), *D. hansenii* PYC ISA 1510 (◇), *C. utilis* (■).....94

Figura 31. Contornos de la superficie de respuesta estimada con medios de fermentación con elagitaninos provenientes de Fresa, se obtuvieron mediante el análisis estadístico de un diseño de mezclas simplex-lattice mediante el programa Statgraphics®. Ácido elálgico (mg/mL): 0 (■); 0.08 (■); 0.16 (■); 0.24 (■); 0.32 (■); 0.4 (■); 0.48 (■); 0.56 (■); 0.64 (■); 0.72 (■); 0.8 (■).....96

Figura 32. Contornos de la superficie de respuesta estimada con medios de fermentación con elagitaninos provenientes de Zarcamora, se obtuvieron mediante el análisis estadístico de un diseño de mezclas simplex-lattice mediante el programa Statgraphics®. Ácido elálgico (mg/mL): 0.11 (■); 0.125 (■); 0.14 (■); 0.15 (■); 0.17 (■); 0.185 (■); 0.2 (■); 0.215 (■); 0.23 (■); 0.245 (■); 0.26 (■).....97

Figura 33. Actividad enzimática β-glucosidasa en: C1 *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (⊕), C2 *C. utilis* y *C. parapsilosis* (⊕), C3 *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510 (⊕) y C4 *P. kluyveri* e *I. terricola* (⊖).....102

Figura 34. Actividad enzimática de Tanasa en: C1 *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (⊕), C2 *C. utilis* y *C. parapsilosis* (⊕), C3 *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510 (⊕) y C4 *P. kluyveri* e *I. terricola* (⊖).....103

Figura 35. Producción de ácido elálgico en: C1 *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (⊕), C2 *C. utilis* y *C. parapsilosis* (⊕), C3 *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510 (⊕) y C4 *P. kluyveri* e *I. terricola* (⊖).....104

Figura 36. Velocidad específica de crecimiento de las corridas del diseño de experimentos de mezclas para la producción de ácido elálgico mediante la hidrólisis de elagitaninos provenientes de Fresa.....106

Figura 37. Tiempo de duplicación de las corridas del diseño de experimentos de mezclas para la producción de ácido elálgico mediante la hidrólisis de elagitaninos provenientes de Fresa.107

Figura 38. Actividad enzimática de tanasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales: *D. hansenii* ISA 1510(2×10^6) / *C. utilis* (2×10^6) / *C. parapsilosis* (2×10^6) (); *D. hansenii* ISA 1510 (); *C. utilis* (); *C. parapsilosis* ().108

Figura 39. Determinación de la actividad b-glucosidasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales: *D. hansenii* ISA 1510(2×10^6)/ *C. utilis* (2×10^6)/ *C. parapsilosis* (2×10^6) (); *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6)/ *C. utilis* (1×10^6)/ *C. parapsilosis* (4×10^6) (); *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6)/ *C. utilis* (4×10^6)/ *C. parapsilosis* (1×10^6) (); *D. hansenii* ISA 1510 (4×10^6)/ *C. utilis* (1×10^6)/ *C. parapsilosis* (1×10^6) (); *D. hansenii* ISA 1510 (); *C. utilis* (); *C. parapsilosis* ().109

Figura 40. Producción de ácido elálgico durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales: *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (1×10^6), *C. parapsilosis* (4×10^6) (); *D. hansenii* ISA 1510 (); *C. utilis* (); *C. parapsilosis* ().....111

Figura 41. Contornos de la superficie de respuesta estimada con medios de fermentación con elagitaninos provenientes de Fresa, se obtuvieron mediante el análisis estadístico de un diseño de mezclas simplex-lattice mediante el programa Statgraphics®. Ácido elálgico (mg/mL): 1.3 (); 1.46 (); 1.62 (); 1.78 (); 1.94 (); 2.1 (); 2.26 (); 2.42 (); 2.58 (); 2.74 (); 2.9 ().113

Abreviaturas

YPD	Yeast Extract Peptone Medium (Medio de peptona y extracto de levadura)
L	Litro
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
Cel	Células
AE	Ácido elágico
g	Gramo
mg	Miligramo
μ g	Microgramo
h	Horas
HHDP	Ácido hexahidroxi-difénico
pH	Potencial de hidrogeno
λ	Longitud de onda
nm	Nanómetros
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nanómetros de longitud de onda
ROO-	Especies reactivas de oxígeno
° C	Grados Celsius
rpm	Revoluciones por minuto
Da	Daltons
KDa	Kilodaltons
% v/v	Porcentaje volumen respecto a volumen
μ	Velocidad de crecimiento
td	Tiempo de duplicación

Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

Los antecedentes acerca de la producción de ácido elágico por degradación enzimática utilizando levaduras son escasos, una de las primeras investigaciones fue conducida por Aoki *et al.*, (1976), en la cual, se realizó la producción y purificación de la enzima tanasa a partir de *Candida sp.* K-1, los datos obtenidos de la caracterización enzimática muestran estabilidad de la enzima en un intervalo de pH de 3.5 a 7.5 donde los parámetros óptimos para pH y temperatura fueron de 6 y 40° C respectivamente.

Una cantidad importante de trabajos de investigación y experimentación sobre la obtención y producción del ácido elágico se enfocan en métodos biotecnológicos para dicho fin, ya que varios autores han mencionado que la obtención de ácido elágico por métodos químicos es más complicado por lo desarrollado de la estructura de la molécula del elagitanino, es decir, resulta más complejo aislar los monómeros de ácido elágico de los otros productos de la degradación química (Cruz-Antonio *et al.*, 2010). Algunos autores mencionan que la liberación del ácido elágico está ligada con la acción de la β -Glucosidasa y la Tanino acil hidrolasa o Tanasa (De la Cruz *et al.*, 2011).

Se encuentran datos registrados donde se habla de la biodegradación de elagitaninos donde se dice que hay hongos que sintetizan enzimas capaces de degradar dichas moléculas. Se han reportado enzimas que hacen tal acción hidrolítica, por ejemplo, la tanasa proveniente de *Aspergillus niger* que interviene en la primera reacción de degradación del elagitanino formando ácido gálico. Tiempo después, en 2003 en la industria del jugo de arándano encontraron, al intervenir en un proceso de fermentación la molécula de ácido elágico bajo la acción de la enzima β -glucosidasa del hongo *Lentinus edodes*, (Vattem y Shetty).

Seeram *et al.*, 2005, investigaron sobre la capacidad antioxidante y antitumoral de varios compuestos polifenólicos como los taninos y el ácido elágico, los cuales obtuvieron resultados positivos respecto a la inducción de la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon con valores de inhibición de la proliferación celular del 30% al 100%, así como una gran actividad antioxidante. Shi *et al.*, 2005 realizaron estudios sobre la producción de ácido elágico por degradación enzimática de valonea taninos de manera comparativa entre *Aspergillus niger* y *Candida utilis* donde reportaron rendimientos de acumulación de ácido elágico de 12.1 y 8.9% (w/w), respectivamente.

Huang *et al.*, 2007 utilizaron *A. oryzae* con *Trichoderma reesei* como fuentes productoras de elagitanasa, xilanasa y celulasa obteniendo el 23% de rendimiento de ácido elágico. Un año después, estos mismos investigadores presentaron su investigación con otro co-cultivo que incluye *A. oryzae* y *Endomyces fibuliger*, obteniendo un 32% de rendimiento de ácido elágico.

Además, Robledo *et al.*, 2008 realizaron la producción de ácido elágico por medio de dos cepas de *Aspergillus niger* (GH1 y PSH) con rendimientos de 6.3 y 4.6 mg de ácido elágico por gramo de cascara de granada donde además concluyeron que la producción de ácido elágico depende mayoritariamente de la actividad enzimática de la elagitanasa.

A su vez Aguilera-Carbó *et al.*, 2009 determinaron las características parciales de la enzima elagitanino acil hidrolasa producida en medio solido por la cepa *Aspergillus niger* GH1, donde obtuvieron un intervalo de pH de 4 a 6 y una temperatura óptima de 60° C.

En 2017 Sepúlveda *et al.* utilizando *A. niger* obtuvieron ácido elágico a partir de residuos de naranja obteniendo 18 mg/ g de fruta seca como rendimiento máximo.

Los estudios para la obtención de ácido elágico a partir de la degradación de elagitaninos, utilizando, diferentes fuentes de elagitaninos, y enzimas provenientes de microorganismos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Estudios realizados en la biodegradación de elagitaninos, destacando la fuente de obtención, el microorganismo utilizado y la enzima producida por cada uno.

Microorganismo	Enzima	Fuente de elagitaninos	Referencia
<i>Rhizopus oligosporus</i>	β -glucosidasa	Pomaza de arándanos	Vattem y Shetty 2003
<i>Lentinus edodes</i>	Tanasa	Pomaza de arándanos	Vattem y Shetty, 2003
<i>A. niger/C. utilis</i>	Sin enzima específica	Corteza de roble	Shi <i>et al.</i> , 2005
<i>A. niger</i> SHL6	Valonea tanino hidrolasa	Corteza de roble	Huang <i>et al.</i> , 2005
<i>A. oryzae</i>	Elagitanasa	Bellotas de roble	Huang <i>et al.</i> , 2007 a
<i>A. oryzae /Trichoderma reesei</i>	Elagitanasa, xilanasa y celulasa	Bellotas de roble	Huang <i>et al.</i> , 2007 b
<i>A. niger</i> GH1	Elagitanasa	Cascara de granada	Robledo <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> PSH	Sin enzima específica	Gobernadora y hojasén	Ventura <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> GH1	Tanasa	Gobernadora	Aguilar <i>et al.</i> , 2008
<i>A. niger</i> GH1	Elagitanasa	Cascara de granada	Aguilera-Carbó <i>et al.</i> , 2009.

Los antecedentes de producción de ácido elálgico utilizando levaduras se muestran en la Tabla 2. Cabe destacar que solamente se cuenta con información clara para la producción utilizando diversas cepas de del género *Candida*, y de manera específica para la enzima tanasa.

Tabla 2. Estudios utilizando levaduras no-convencionales como fuentes de enzimas como tanasa y/o β -glucosidasa.

Levadura	Referencia
<i>Candida sp.</i>	Aoki <i>et al.</i> , 1976
<i>Pichia pastoris</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1984
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1984
<i>Candida sp.</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>Mycotorula japonica</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>C. utilis</i>	Shi <i>et al.</i> , 2005

1.2 Justificación de la investigación

En la actualidad, gran cantidad de biomoléculas se asocian con propiedades “especiales”, algunas útiles para combatir ciertas enfermedades degenerativas. El ácido elálgico y los elagitaninos se utilizan materia prima en las industrias farmacéutica y/o médica, ya que los beneficios encontrados en estos compuestos son diversos. Debido a la actividad biológica que presentan, los han puesto en el centro de la investigación para tratamiento preventivo de enfermedades crónicas o para disminuir sus efectos (Aguilera-Carbó, 2009). Entre estos beneficios se encuentran sus capacidades antioxidantes, anticancerígeno, reducción o prevención de enfermedades tales como padecimientos cardiacos, hipertensión, disminución de colesterol. Además, tienen aplicación antiviral, por el bloqueo de la interacción de la glucoproteína 120 del VIH, por mencionar algunas de las más destacadas y de mayor auge o importancia. El ácido elálgico es un compuesto nutracéutico perteneciente a los compuestos fenólicos que ha adquirido gran interés en los últimos años debido a las propiedades benéficas que se le han demostrado, principalmente como antioxidante y anticancerígeno al inhibir la formación de tumores (Wildam., 2001).

La forma tradicional de obtención de ácido elálgico es a través de procesos que involucran sustancias altamente contaminantes como ácidos y bases, además requieren gran cantidad de energía calorífica. Esto ha propiciado la búsqueda del desarrollo de procesos biológicos que permitan obtener ácido elálgico. Las recientes investigaciones sobre estos procesos se han dirigido hacia fuentes naturales ricas en compuestos fenólicos, como son los elagitaninos, que puedan ser degradados por enzimas provenientes de especies fúngicas, sin embargo, el proceso de producción

utilizando hongos filamentosos conlleva una serie de problemas que disminuyen su rendimiento. Obtener el ácido elágico de manera sintética con una hidrólisis ácida tiene mayor rendimiento en cuanto a la cantidad producida, pero para el proceso de separación no existe un método que elimine completamente los solventes, además, la hidrólisis ácida produce productos secundarios no deseados.

En cambio, la obtención de ácido elágico a partir de una hidrólisis enzimática con microorganismos como los hongos filamentosos, por ejemplo, *Aspergillus niger*, es un proceso que elimina los inconvenientes antes descritos. A pesar de que este hongo produce enzimas capaces de hidrolizar los elagitaninos presentes en frutos y vegetales, el proceso conlleva una serie de problemas, como son el tiempo prolongado de fermentación y el estado físico del medio, que dificulta la extracción y la purificación enzimática así como una separación complicada del producto final. Es por esta razón que se requiere implementar procesos alternativos para la producción de ácido elágico utilizando distintas cepas de levaduras no convencionales para la degradación enzimática de elagitaninos obtenidos de extractos de la fresa y zarzamora, para disminuir los tiempos de fermentación y tener un medio fácil de manejar.

1.3 Planteamiento del problema

Se requieren alternativas a la producción de ácido elágico, utilizando degradación enzimática de elagitaninos obtenidos de fresa y zarzamora, con enzimas producidas a partir de distintas cepas levaduras no-convencionales, en cultivos puros y mixtos, con la finalidad de aumentar el rendimiento de este proceso. En este trabajo se plantea ya que el ácido elágico obtenido en medio con levaduras se separa de los demás componentes de manera sencilla con métodos como filtración, centrifugación, decantación, por mencionar algunos. La meta es verificar que el utilizar levaduras no-convencionales en lugar de hongos filamentosos para producción de ácido elágico es factible y eficiente.

1.4 Hipótesis

Si se cultivan consorcios microbianos, puros y mixtos, a nivel biorreactor de levaduras no-convencionales, entonces se promoverá alta actividad enzimática de tanasa, β -glucosidasa y elagitanasa para obtener ácido elágico por degradación de elagitaninos presentes en las frutillas fresa y zarzamora.

1.5 Objetivo general

Obtener ácido elágico a nivel biorreactor, a partir de la degradación de elagitaninos, provenientes de fresa y zarzamora, aprovechando la actividad enzimática de cepas de levaduras no- convencionales, productoras de β -glucosidasa, tanasa y elagitanasa en cultivos puros y mixtos.

1.6 Objetos particulares

I: Caracterizar químicamente a las frutillas fresa y zarzamora.

Objetivos específicos:

- ✓ Realizar análisis bromatológico de las frutillas a utilizar, fresa y zarzamora.
- ✓ Determinar el estado de madurez de las frutillas.
- ✓ Seleccionar condiciones de extracción con solventes de compuestos fitoquímicos.
- ✓ Establecer un diseño experimental para la extracción de compuestos fitoquímicos evaluando el efecto de la temperatura, tiempo de reposo, y estado de madurez de la frutilla, con tres diferentes solventes.
- ✓ Evaluar la actividad microbiciada y capacidad antioxidante de los extractos obtenidos.
- ✓ Determinar el contenido total de fenoles y flavonoides en las frutillas fresa y zarzamora.
- ✓ Identificar el contenido total de elagitaninos por estado de madurez.
- ✓ Analizar estadísticamente los resultados obtenidos, para obtener las mejores condiciones de extracción de compuestos fitoquímicos.

II: Obtener ácido elágico por degradación enzimática de elagitaninos a diferentes condiciones, mediante cultivos individual y mixto de diferentes cepas de levaduras no convencionales.

Objetivos específicos:

- ✓ Determinar presencia de las enzimas tanasa, β -glucosidasa y elagitanasa en siete cepas de levaduras no convencionales (*D. hansenii* (PYC 2968 y ISA1510), *Candida utilis*, *Candida parapsilosis*, *Pichia kluyveri*, *Issatchenkia terricola*, *Pichia pastoris*).
- ✓ Seleccionar las cepas que presenten la mayor actividad enzimática.

III: Obtener ácido elágico a nivel biorreactor.

Objetivos específicos:

- ✓ Formular un diseño experimental de mezclas para la obtención de ácido elálgico evaluando el efecto de temperatura, pH y concentración de sustrato sobre la actividad enzimática en cultivos puros y mixtos.
- ✓ Obtener mediante un programa estadístico (Statgraphics®) el intervalo óptimo para la degradación de elagitaninos utilizando las diferentes enzimas.
- ✓ Determinar la concentración de ácido elálgico producido a nivel biorreactor en cultivos puros y mixtos.

IV: Optimización del proceso de obtención

Objetivos específicos:

- ✓ Realizar pruebas de competencia de las siete cepas de levaduras y seleccionar el consorcio adecuado.
- ✓ Obtener mediante un programa estadístico (Statgraphics®) un diseño de mezclas SIMPLEX-LATTICE, con 3 réplicas en el punto central.
- ✓ Determinar la concentración de ácido elálgico producido a nivel biorreactor en cultivos puros y mixtos.

Capítulo II. Marco teórico

2.1 Generalidades de los polifenoles

Los alimentos son sistemas complejos que varían en composición y destino biológico. Son fuente de nutrimentos tradicionales como proteínas, carbohidratos y grasas. Además, contienen otra gama de compuestos que al ser ingeridos tienen la capacidad de alterar los procesos metabólicos del organismo (Beecher, 2003). Cuando estos compuestos provienen de fuentes vegetales se les conoce como fotoquímicos (Andrés *et al.*, 2010).

Los compuestos polifenólicos son un grupo de fotoquímicos que no se identifican como nutrientes esenciales, pero se le atribuyen efectos positivos sobre la salud, especialmente por su actividad como antioxidantes (Vázquez *et al.*, 2012).

Los compuestos polifenólicos varían ampliamente en estructura, desde los más simples (monómeros y oligómeros) hasta los polímeros complejos de peso molecular alto denominados taninos.

2.2 Taninos

Los taninos son polifenoles presentes en la naturaleza que representan el cuarto constituyente más abundante en las plantas después de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina. (Lekha *et al.*, 1997), son solubles en agua, de peso molecular variable de 500 Da a 20000 kDa (Reed, 2010).

Los taninos son compuestos que no solo poseen elevado peso molecular, sino además presentan suficientes grupos hidroxilo unidos a estructuras fenólicas que les confieren la característica de formar complejos con proteínas, minerales y otras macromoléculas (Reed, 2010).

Los encontramos disponibles en frutos y plantas además de sus componentes en diferentes proporciones como tallos, hojas, cortezas, troncos y raíces. Dicho compuesto se obtiene como metabolito secundario de las plantas, y le confiere a las mismas una protección contra microorganismos e insectos de ser atacadas debido actúa sobre las proteínas de los animales al ser ingeridas puesto que provoca un sabor astringente y desagradable y una vez la molécula unida a un polisacárido o proteína no es fácil su degradación (Cruz Antonio *et al.*, 2014). Los taninos son extraídos de plantas y algas, y se clasifican de acuerdo con su base como puede ser el ácido elágico, ácido gálico y floroglucinol. Estas moléculas se pueden ensamblar en estructuras poliméricas que alcanzan un alto peso molecular y de acuerdo a esto tienen distinta capacidad para interactuar con proteínas u otras macromoléculas además de ser susceptibles a la hidrólisis química o enzimática

que será lo que los clasifique en taninos condensados hidrolizables y complejos (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014).

La importancia de los taninos en la ingesta de alimentos es dada a que proporcionan un factor importante para la prevención de posibles enfermedades degenerativas como las cardiovasculares y el cáncer por su actividad antioxidante debido a sus propiedades redox que, intervienen sobre la adsorción y neutralización de los radicales libres (Cruz Antonio *et al.*, 2014). Estos compuestos han sido utilizados a lo largo de la historia en el campo médico, nutrición, saborizantes y fragancias. Son importantes en el sector biológico puesto que, funcionan como repelentes contra insectos y microorganismos que puedan afectar la integridad de la planta, también de la misma manera actúan sobre frutos hasta antes de su maduración. Tienen aplicación industrial por sus propiedades intrínsecas para la fabricación de tintes café, amarillo y rojos, también para elaboración de pegamentos, como control de lodos en la extracción de petróleo y para el curtido de pieles industriales (Cruz Antonio *et al.*, 2014).

Los taninos se pueden clasificar en dos grupos principales de acuerdo con la posibilidad o no de hidrolizarlos, los taninos hidrolizables y los taninos condensados. Los primeros contienen moléculas de ácido gálico, elágico, digálico, chebulico, los cuales se unen mediante enlaces ésteres a moléculas de glucosa originando los galotaninos y elagitaninos entre otros. (Aguilar *et al.*, 2001). Por otra parte, los taninos complejos están constituidos mayoritariamente por cianidina y delphinina los cuales forman complejos constituidos por flavonoides generalmente conocidos como proantocianidinas. Adicionalmente existe otro tipo de taninos producto de la unión de grupos flavonoides a elagitaninos, los cuales llevan el nombre de taninos condensados (Aguilar *et al.*, 2001). De esta manera Khanbabaee *et al.*, (2001) clasifican a los taninos en cuatro grupos principales: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados y taninos complejos, de los cuales se derivan una gran variedad de compuestos de mayor complejidad.

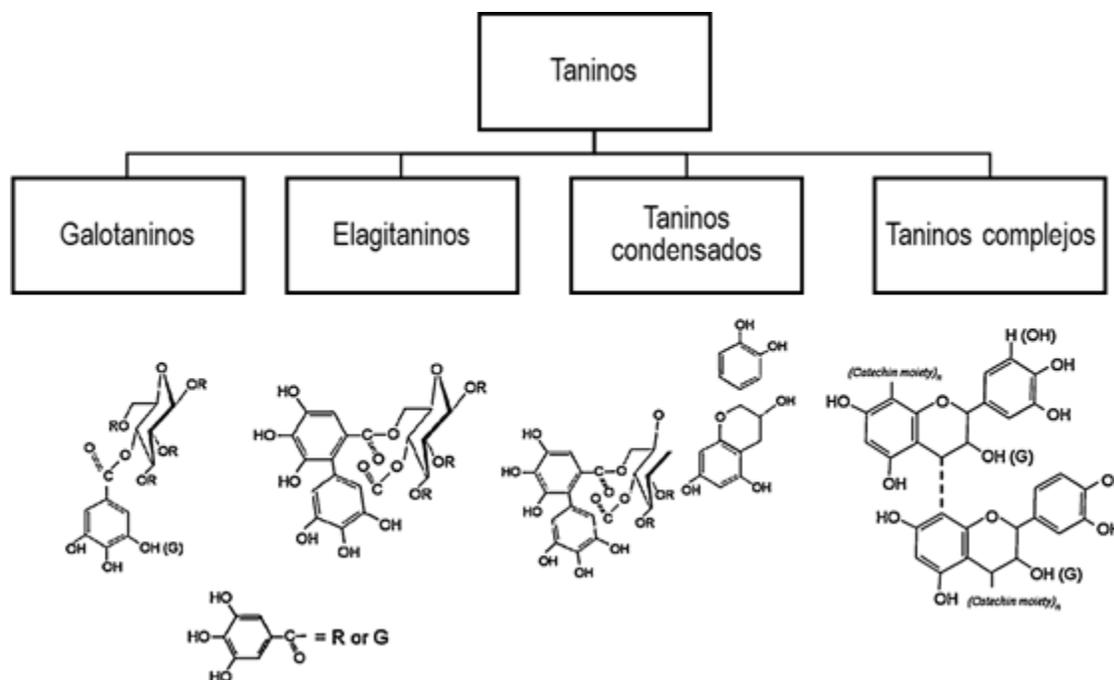


Figura 1. Clasificación de los taninos. (Tomado y modificado de Khanbabaee y Van Ree 2001).

Como se observa, los elagitaninos han sido clasificados como una subdivisión de los taninos hidrolizables, que son de interés ya que son los precursores del ácido elágico, al tener en su estructura molecular un grupo hexahidroxidifénico.

2.3 Elagitaninos como precursores del ácido elágico

Los elagitaninos son una subdivisión de los taninos hidrolizables, y tienen como característica principal el grupo hexahidroxidifénico (HHDP), que, al ser liberado, sufre una lactonización espontánea, esto consiste en un reacomodo de la molécula pasando a ser el ácido elágico (Figura 2), que es una molécula más estable (Aguilera-Carbó, 2009).

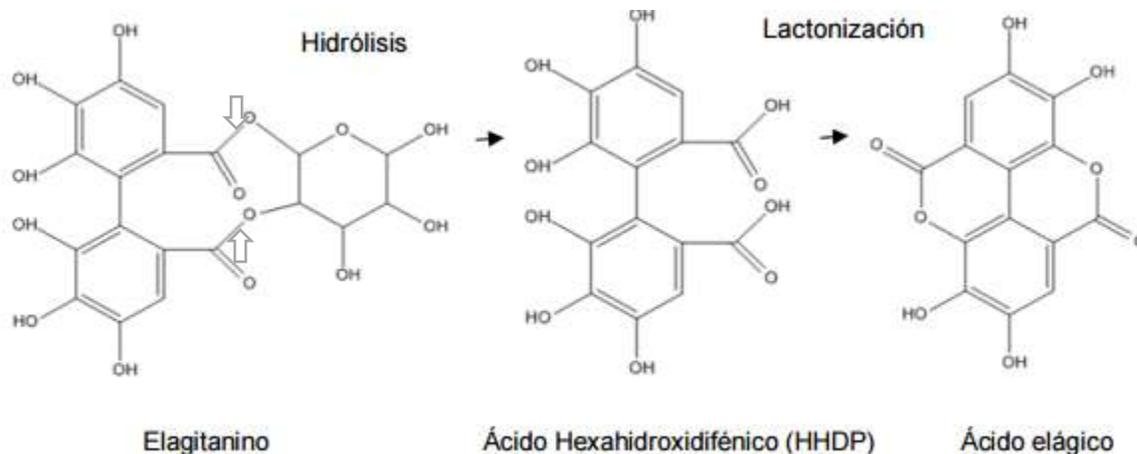


Figura 2. Hidrólisis de elagitaninos y lactonización del grupo HHDP. (Tomado y modificado de De la Cruz *et al.*, 2011).

Los elagitaninos son compuestos derivados del pentagalolil-glucosa por reacciones de oxidación de la molécula del ácido gálico, esta, mediante una hidrólisis se genera el ácido hexahidroxidifénico que espontáneamente por una lactonización, produce la molécula de ácido elágico y otra de la glucosa sobrante (Cruz Antonio *et al.*, 2014).

Los elagitaninos se clasifican de acuerdo con el número de HHDP que se encuentren en la molécula, pueden ser monoméricos, poliméricos u oligoméricos conforme al grado de polimerización que tenga (Aguilera-Carbó, 2009).

Los elagitaninos se han reportado en una gran variedad de especies principalmente en las secciones no comestibles de las plantas como son las raíces, las hojas, los tallos y las semillas; pero a diferencia de otros taninos los elagitaninos se han reportado únicamente en la familia de las angiospermas. (Yoshida *et al.*, 2010).

Por otra parte, la mayor contribución de elagitaninos en la dieta occidental corresponde a los frutos rojos como la fresa, zarzamora y la frambuesa. En la fresa se encuentran principalmente en la pulpa en forma de ácido elágico o de ésteres, y en la zarzamora y frambuesa se encuentran distribuidos en las semillas. Los elagitaninos que se han encontrado en estas especies corresponden a la sanguinina, casuarictina, potentilina y pedunculagina (Clifford *et al.*, 2000).

La ruta de degradación enzimática de los elagitaninos ha sido estudiada ampliamente hasta los productos Acetil-CoA y piruvato, sin embargo, las etapas iniciales de la degradación aún no han sido esclarecidas por completo, esto debido a la gran variedad de elagitaninos. Actualmente se

conoce la intervención de enzimas tanasas, celulasas y glucosidasas en la degradación inicial de los elagitaninos (Figura 3).

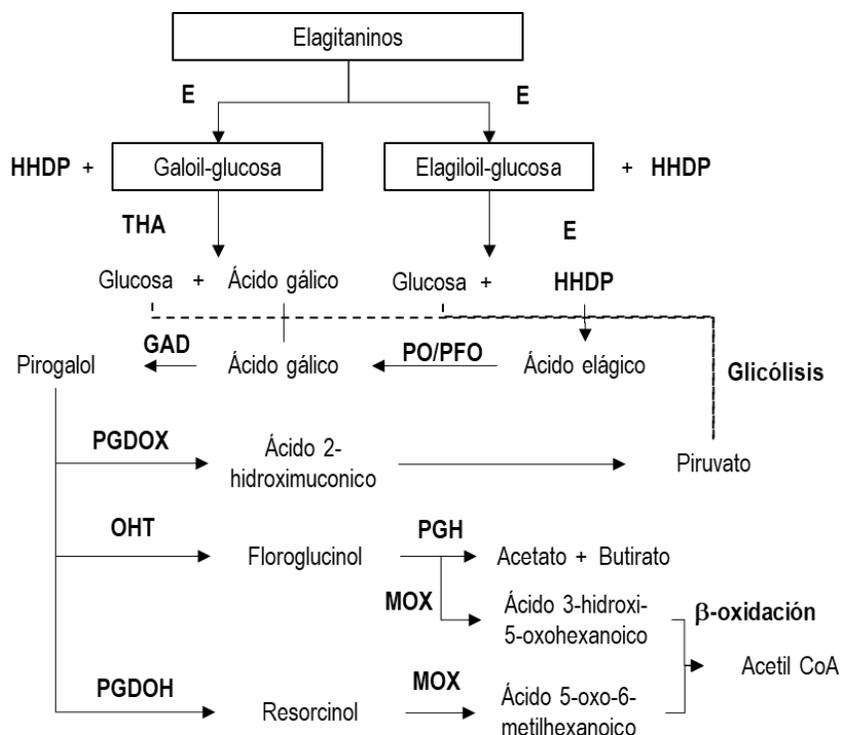


Figura 3. Biodegradación de elagitaninos, E: enzima desconocida, THA: tanino acil hidrolasa, PO: peroxidasa, PFO: polifenol oxidasa, GAD: ácido gálico descarboxilasa, PGDOX: pirogalol dioxigenasa, OHT: hiroxiltransferasa, PGDOH: pirogaloldeshidroxilasa, PGH: floroglucionol hidrolasa, MOX: monoxigenasa. (Tomado y modificado de Aguilera-Carbo et al., 2009).

Los elagitaninos a diferencia de los galotanimos contienen un enlace C-C que le confiere mayor dificultad para la degradación. Investigaciones previas sugieren que la degradación enzimática de estos compuestos se debe a enzimas llamadas elagitanasas con características similares a las tanasas (Shi *et al.*, 2005), así también se ha reportado la utilización de la enzima β-glucosidasa y su contribución en la degradación enzimática de taninos (Vattem y Shetty, 2003).

Como se observa en la Figura 3, se obtienen como producto de degradación de los elagitaninos moléculas de ácido gálico y ácido elágico, las cuales son consideradas como compuestos nutraceuticos debido a las propiedades que presentan y que pueden utilizadas en el

diseño de nuevos fármacos, síntesis de materiales con capacidad antimicrobiana, o diseño de alimentos funcionales.

2.4 Ácido elágico

El ácido elágico (Figura 4), es una molécula fenólica que está presente en forma libre en vegetales como producto del metabolismo de ellos, también pueden encontrarse a partir de sus precursores que son los elagitaninos que también provienen del metabolismo secundario del vegetal, estructuralmente se trata de un dímero derivado del ácido gálico que se puede encontrar en los frutos de forma libre, glicosilado o en estructuras complejas como son los elagitaninos (Seeram *et al.*, 2004).

Las moléculas de los elagitaninos contienen en su estructura química HHDP (Ascacio-Valdés *et al.*, 2013). La cuál, por medio de una lactonización dan origen a la molécula de ácido elágico. La molécula está formada por dos lactonas (que son esterificaciones intermoleculares), cuatro grupos hidroxilo que le brindan su capacidad antioxidante y dos anillos aromáticos.

La molécula del ácido elágico es muy estable, con punto de fusión de 362° C y peso molecular de 302.2 g/mol, su nomenclatura IUPAC 2,3,7,8-tetrahidroxicromeno[5,4,3-cde]chromeno-5,10-diona. Es insoluble el agua y una baja solubilidad en solventes orgánicos ya que el anillo aromático tiene propiedades lipofílicas y los cuatro grupos y las lactonas le confieren propiedades hidrofílicas (Muthukumaran *et al.*, 2017).

La propiedad más importante del ácido elágico es su capacidad para formar complejos con otras moléculas, siendo esta propiedad una de las más aprovechadas en las distintas aplicaciones que se le dan a los elagitaninos (Cruz-Antonio *et al.*, 2010).

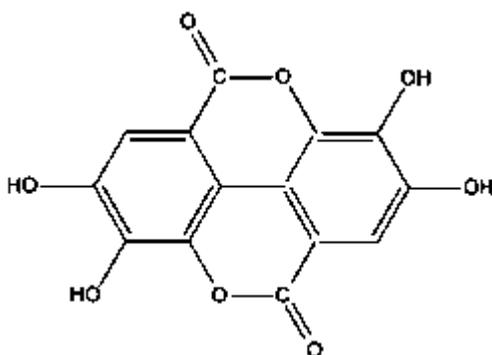


Figura 4. Molécula de ácido elágico (Tomado y modificado de Cruz Antonio *et al.*, 2014).

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

En vista de estas propiedades del ácido elágico, se han realizado distintos trabajos de investigación sobre su producción por procesos biotecnológicos como los reportados por Vattem y Shetty (2003), Huang *et al.*, (2008), Aguilera-Carbó (2009).

2.5 Actividades biológicas del ácido elágico

2.5.1 Actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar, inhibir o prevenir la oxidación de compuestos oxidables, atrapando radicales libres y disminuyendo el estrés oxidativo (Ani *et al.*, 2006). El mecanismo del ácido elágico, en particular, es muy complicado ya que interactúa en diversos mecanismos como: 1) oxidación por radicales libres reactivos; 2) reacciones que involucran grupos hidroxilo nucleófilos; y 3) sustitución aromática electrofílica de sus anillos aromáticos ricos en electrones (Ahmed *et al.*, 2016, Selva *et al.*, 2017). El ácido elágico también puede enlazar o interactuar con importantes macromoléculas biológicas como el ADN, enzimas, y otras proteínas, así como sustancias más pequeñas incluyendo minerales (Selva *et al.*, 2017). Se demostró que el ácido elágico se une covalentemente al ADN en estudios *in vitro* y esto se ha sugerido como un mecanismo para sus actividades antimutagénicas y anticancerígenas (Zhang *et al.*, 2014; Selva *et al.*, 2017). Del mismo modo, la interacción del ácido elágico con ciertas enzimas, como VEGFR-2 quinasa, y β -glucosidasa, puede dar efectos beneficiosos para prevenir y controlar el cáncer de mama, hiperglucemia e hipertensión (da Silva Pinto *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014; Selva *et al.*, 2017). Los estudios *in vitro* también mostraron que el ácido elágico muestra una actividad quelante efectiva de los iones ferrosos (Fe^{2+}), que contribuye a sus propiedades

antioxidantes (Kilic *et al.*, 2014), y se une al suero humano albúmina, la principal proteína transportadora en el suero sanguíneo (Pattanayak *et al.*, 2017).

2.5.2 Actividad anti-lipoxidación o disminución de LDL

La propiedad antioxidante previene la formación de colesterolemias. Se han realizado estudios sobre esta propiedad y se evaluaron los polifenoles totales de nuez (*Juglans regia*), se demostró que el ácido elálgico en sinergismo con otros polifenoles reduce los niveles de LDL (Anderson *et al.*, 2001), previniendo riesgos de problemas cardiacos y obstrucción de venas.

2.5.3 Actividad anti-mutagénica y anti-carcinogénica

La reacción coordinada entre el ácido elálgico y un típico carcinogénico benzo[α]pireno-7,8-diol-9,10-epoxido (BPDE), prueba al ácido elálgico como un agente quimioprotector contra tipos de cáncer causados por aromáticos policíclicos (PAHs) (Huetz *et al.*, 2005), inhibiendo la mutación de células sanas. El ácido elálgico es conocido por su acción de modular la activación de carcinogénesis por medio de la inhibición de las enzimas de la fase 1 del citocromo P450 e induce las enzimas de la fase 2 que están involucradas en la detoxificación carcinogénica. El ácido elálgico a concentraciones entre 1-100 $\mu\text{m/L}$, mostró una fuerte actividad anti-proliferativa contra células cancerígenas de colon, pulmón y próstata (Losso *et al.*, 2004). Se han reportado investigaciones sobre la inhibición de la proliferación de células malignas de cáncer de piel (melanoma), cáncer de mama, de estómago, esófago, hígado y otros (Clifford y Scalbert 2000; Seeram *et al.*, 2005). Ahire y Mishra, en el 2017 reportaron que el consumo de ácido elálgico reduce los efectos secundarios que se presentan en el cuerpo después de ser sometido a un proceso de radiación, como la reducción de células con aberraciones y fragmentación en los cromosomas, así como las peroxidaciones lipídicas, inhibe la formación de eritrocitos policromáticos y el rompimiento de la cadena de ADN durante el proceso de radiación.

2.5.4 Actividad antimicrobiana

El ácido elálgico ha probado ser un potente antimicrobiano, se han realizado trabajos experimentales contra patógenos como *Staphylococcus aureus* en donde no permitió la coagulación del plasma en un tiempo de incubación de 24 h a 37° C, inhibiendo el crecimiento del microorganismo (Akiyama *et al.*, 2001). En otro estudio los precursores del ácido elálgico (Punicalagina), obtenidos de cáscara de granada (*Punica granatum L.*), mostraron actividad

antibacterial contra 18 cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina (por sus siglas en inglés MRSA), con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 61.5 µg/mL (Machado *et al.*, 2002).

2.5.5 Actividad antiviral

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

2.5.6 Actividad gastroprotectiva

La activación de células pancreáticas es el primer paso en el desarrollo de la fibrosis pancreática, el AE ha demostrado inhibir esta activación (Masamune *et al.*, 2008). El efecto gastroprotectivo de los extractos de *Quercus suber* y *Quercus coccifera* y algunos taninos, como pedunculagina, castalagina, filliraeoidina A y acutissimina B, purificados de los extractos, fueron probados en ratones usando el modelo de úlcera gástrica inducida por etanol. Ambos extractos inhibieron la formación de las úlceras, lo mismo sucede con los taninos purificados utilizados, dentro de los cuales destaca el elagitanino castalgin como el más potente (Khenouf *et al.*, 2003).

2.5.7 Reducción de los niveles de glucosa

Algunos precursores del ácido elágico (lagerstroemina, flosina B y reginina A) fueron aislados de una planta del sur de Asia (*Lagerstroemia speciosa*), empleada por los nativos para controlar la diabetes mellitus. Los compuestos aislados incrementaron el transporte de glucosa en adipocitos de rata pudiendo reducir los niveles de glucosa en la sangre. Sin embargo, es necesario

el estudio detallado de este fenómeno debido a que no está dilucidado el mecanismo de estimulación del transporte de glucosa por estas moléculas (Hayashi *et al.*, 2002). Otra aplicación del ácido elágico es su capacidad de formar quelatos con metales (Przewloka y Shearer, 2002). Aún más el AE en forma de elagitanino tiene gran aplicación en la industria cosmética para la elaboración de cremas, agua de tocador, perfumes, maquillaje, corrector y otros productos, los cuales tienen un efecto aclarador de la piel.

2.6 Fuentes de obtención de elagitaninos y ácido elágico

La principal fuente de obtención de elagitaninos y ácido elágico es la vegetal, principalmente de hojas, ramas, raíces, tallos, frutos y cortezas, como las del roble y el castaño (Lei *et al.*, 2002). Se sabe también que los elagitaninos y el ácido elágico son consumidos por el hombre de manera común en frutas, semillas y en alimentos o bebidas elaborados a partir de ellos, como jugos o zumos de frutas, mermeladas (Clifford y Scalbert, 2000). Los frutos de bayas ampliamente reportados son fresas, arándanos, frambuesas, zarzamora, mora (Lei *et al.*, 2002; Vatterm y Shetty, 2003), también se encuentran en nueces, raíces y hojas de diferentes plantas. Tabla 3.

Tabla 3. Alimentos ricos en elagitaninos y de importancia económica. (Tomado y modificado de Clifford y Scalbert, 2000).

Familia	Nombre Científico	Nombre común
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Nuez de la india
	<i>Pistacio vera</i>	Pistache
	<i>Mangifera indica</i>	Mango
<i>Betulaceae</i>	<i>Corylus avellana</i>	Avellana
<i>Ebenaceae</i>	<i>Diospyros kaki</i>	Persimonio
<i>Fagaceae</i>	<i>Castanea sativa</i>	Castaña
<i>Juglandaceae</i>	<i>Juglans regia</i>	Nuez
	<i>Psidium guajava</i>	Guayaba
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Clavo
	<i>Pimenta officinalis</i>	Pimiento verde
<i>Punicaceae</i>	<i>Punica granatum</i>	Granada
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus domestica</i>	Ciruela
	<i>Prunus armeniaca</i>	Chabacano

	<i>Prunus pérsica</i>	Durazno
	<i>Prunus avium</i>	Cereza Silvestre
	<i>Fragaria spp</i>	Fresa
	<i>Rubus idaeus</i>	Frambuesa
	<i>Rubus fruticosus</i>	Zarzamora
	<i>Ribes nigrum</i>	Grosella negra
	<i>Ribes rubrum</i>	Grosella roja
	<i>Ribes grosularia</i>	Grosella silvestre
<i>Theaceae</i>	<i>Camelia sinensis</i>	Té verde
<i>Vitaceae</i>	<i>Vitis vinífera</i>	Uva

2.6.1 Frutillas como fuentes potenciales de elagitaninos

Los estudios de epidemiología han encontrado las ventajas del consumo de vegetales por sus propiedades contra enfermedades crónicas. Las fresas y zarzamoras son frutas que se consumen frescas o procesadas y en ellas se encuentra una alta cantidad de compuestos fenólicos que promueven la salud de quienes la consumen. Ahora se tiene información de que los polifenoles actúan como factores de señalización, es decir, se involucran en la modulación de señales que afectan la función celular, la expresión genética y el efecto directo en el sistema digestivo. Uno de los compuestos fenólicos que se encuentran en las frutillas son las antocianinas que les da su color rojo brillante, otros son los taninos hidrolizables como los elagitaninos. También tiene una cantidad de taninos condensados como proantocianidina (Aaby *et al.*, 2012).

La fresa y la zarzamora pertenecen de la familia de las Rosáceas, y al género *Fragaria* y *Rubus*, respectivamente. La zarzamora es una planta invasora de crecimiento rápido, cuyas ramas espinosas pueden crecer hasta 3 metros, y puede multiplicarse vegetativamente generando raíces desde sus ramas, esta planta es popularmente conocida por sus frutos comestibles, un tipo de bayas carnosas conocidas como zarzamora o mora, de color rojo tornándose a negro al madurar (Sánchez, 2008). La fresa es una planta vivaz, herbácea, de hojas con los bordes dentados. Tienen forma cónica o redonda según la variedad, de color rojo intenso o rojo anaranjado. Su carne es perfumada, carnosa y mantecosa, desasiéndose en la boca al aplicársele una mínima presión con sabor que varía de ácido a muy dulce, presentan un fuerte aroma la cual es capaz de impregnar con su perfume varios metros a la redonda. En la fresa, el ácido elágico está más concentrado en los acenos (semillas), que están en la superficie de la fruta, que en la pulpa o pulpa de la fruta que carece de

aquenos. En consecuencia, la fruta entera es más rica en ácido elágico que la pulpa y algunos de sus productos derivados (por ejemplo, jugos y purés de fresa sin semillas).

La composición de la fresa varía con el genotipo de cada una, los factores de la práctica agrícola, el medio ambiente en que se desarrollen y su grado de maduración (Aaby *et al.*, 2012). Para el establecimiento de la plantación de fresa como en la utilización de coberturas y riego es recomendable hacerlo en líneas de 70 a 80 cm de ancho y de 20 cm de altura (SAGARPA, 2017). Pueden colocarse dos hileras de las plantas y separarlas 40 cm entre sí (SAGARPA, 2017), a una profundidad tal que el cuello de la raíz quede a nivel del suelo y no exponer las raíces ni la corona.

Las condiciones edáficas y climáticas del cultivo de fresa a altas temperaturas y en días largos de 12 h de luz aproximadamente provocan un crecimiento vegetativo excesivo, en cambio, a bajas temperaturas y en días cortos se induce a la floración. A una altura de 1,300 y 2,000 metros sobre el nivel de mar (SAGARPA, 2017) es la zona más apta para la producción de la fresa, esta prefiere suelos equilibrados en nutrientes, ricos en materia de tipo orgánica, suelos aireados y bien drenados con cierta capacidad de retención de agua (SAGARPA, 2017).

La producción de fresa en México ocupa un 2,19% de la producción de frutas y 1.14% del PIB agrícola nacional, de esta producción un 52.21% es destinada a exportación y con esto, México ocupa un tercer lugar como proveedor de fresa fresca al mercado internacional con un 14.83% del valor de las exportaciones mundiales (SAGARPA, 2017). Para la zarzamora se estimó una producción de 169, 010 Ton., siendo México el primer productor con el 25% de contribución de la producción total, seguido de Estados Unidos y Polonia con 20% y 23 % respectivamente.

2.7 Extracción de compuestos fotoquímicos

La extracción de compuestos fotoquímicos a partir de productos frescos se lleva a cabo, principalmente, por extracción con solventes polares como es etanol, metanol, acetona, propanol y acetato de etilo, a diferentes concentraciones en agua (Antolovich *et al.*, 2000; Luthria y Mukhopadhyay, 2006). Convirtiéndose en un paso fundamental previo para la cuantificación precisa de capacidad antioxidante. Aunado al método de extracción empleado, la naturaleza de los compuestos fenólicos y el método de ensayo, son los tres factores que influyen en la cuantificación de compuestos fenólicos en fuentes vegetales (Allothman *et al.*, 2009). La recuperación de los polifenoles a partir de materiales vegetales es influida por la solubilidad de los compuestos fenólicos en el disolvente utilizado para el proceso de extracción. Además, la polaridad del

disolvente jugará un papel clave en el aumento de la solubilidad del compuesto fenólico (Naczki y Shahidi, 2006). Por lo tanto, es difícil desarrollar un procedimiento de extracción de fenoles adecuado para la extracción de toda la planta. Mezcla de etanol y agua se utilizan comúnmente para la extracción de fenoles a partir de fuentes vegetales (Bahorun *et al.*, 2004; Durling *et al.*, 2007). Esto es debido a la amplia gama de fenoles que las mezclas acuosas de etanol pueden disolver. Por otro lado, las mezclas de acetona-agua son buenos sistemas de disolventes para la extracción de antioxidantes polares (Sun *et al.*, 2002; Bahorun *et al.*, 2004).

2.8 Biosíntesis de ácido elágico

El ácido elágico es un compuesto fenólico, derivado dimérico del ácido gálico, que en los frutos que lo contienen se puede encontrar en forma libre, glicosilado o como simple o complejos elagitaninos (ésteres de ácido hexahidroxi-difénico). La hidrólisis ácida de estos últimos produce ácido elágico libre la subsecuente liberación de unidades hexahidroxidifenol (HHDP) y de un grupo éster (Olivas-Aguirre *et al.*, 2014). Diferentes microorganismos pueden degradar los elagitaninos, debido a que secretan enzimas inducidas específicamente para romper los enlaces éster de los elagitaninos, liberando de este modo glucosa y el grupo HHDP que de acuerdo con lo reportado por Aguilera-Carbó *et al.* (2008), este grupo sufre una lactonización espontánea para formar el ácido elágico, un compuesto mucho más estable. El ácido elágico es producido por las plantas como un metabolito secundario, se acumula en las vacuolas de las células de dos formas: hidrolizado o en forma de elagitanino, su precursor. Agrimoniin y sanguin H-6 son los dos tipos de elagitaninos más abundantes en la fresa (Vrhovsek *et al.*, 2012; Lipińska *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2015; Selva *et al.*, 2017). Los elagitaninos son más solubles en agua que el ácido elágico (Landete, 2011). Los fenoles de las plantas, incluidos el ácido elágico y los elagitaninos, se han asociado con funciones biológicas diversas en las plantas, como la defensa contra bacterias, hongos, virus y herbívoros animales, así como la protección contra la radiación solar, que puede beneficiar el rendimiento y el manejo integrado de plagas al aumentar la resistencia de las plantas a algunas enfermedades (Treutter, 2010; Amil-Ruiz *et al.*, 2011; Schulenburg *et al.*, 2016).

2.9 Microorganismo con capacidad de biodegradación de elagitaninos

Diversos organismos han sido evaluados en la biodegradación de los taninos, destacando los hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en los cuales se ha demostrado la presencia de la enzima tanasa y se ha mejorado el proceso de fermentación para alcanzar mejores

rendimientos enzimáticos, optimizar los procesos de extracción y de purificación tanto de las enzimas como de los productos. Existen tres sistemas de fermentación utilizados para el cultivo de hongos filamentosos, los cuales son la fermentación líquida sumergida, fermentación líquida de superficie y fermentación en estado sólido (Banerjee *et al.*, 2012).

Tabla 4. *Microorganismos degradadores de elagitaninos.*

Microorganismos	Referencia
Hongos filamentosos	
<i>A. fumigatus</i> CAS-21	Cavalcanti <i>et al.</i> , 2018
<i>Ascochyta boltshauseri</i>	Lekha y Lonsane, 1997
<i>Ascochyta pisi</i>	Lekha y Lonsane, 1997
<i>Ascochyta viciae</i>	Lekha y Lonsane, 1997
<i>A. acidus</i>	Prigione <i>et al.</i> , 2018
<i>A. aculeatus</i>	Banerjee <i>et al.</i> , 2001; El-Tanash <i>et al.</i> , 2011
<i>A. aureus</i>	Bajpai y Patil, 1997
<i>A. awamori</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996; Mahapatra <i>et al.</i> , 2005; Beena <i>et al.</i> , 2011; Prigione <i>et al.</i> , 2018
<i>A. caespitosus</i>	Batra y Saxena, 2005
<i>A. carbonarius</i>	Serrani Valera <i>et al.</i> , 2015
<i>A. carneus</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. costaricensis</i>	Prigione <i>et al.</i> , 2018
<i>A. ficuum</i>	Ma <i>et al.</i> , 2015
<i>A. fischeri</i>	Bajpai y Patil 1997
<i>A. Omflavipes</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. flavus</i>	Yamada <i>et al.</i> , 1968; Batra y Saxena, 2005
<i>A. foetidus</i>	Banerjee <i>et al.</i> , 2001
<i>A. fumigatus</i>	Batra y Saxena, 2005
<i>A. japonicus</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977; Bradoo <i>et al.</i> , 1996
<i>A. nidulans</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>A. niger</i>	Knudson, 1913; Haslam y Stangroom, 1966; Lekha y Lonsane, 1994; Bradoo <i>et al.</i> , 1996; Murugan <i>et al.</i> , 2007; Prigione <i>et al.</i> , 2018; Rana y Bhat, 2005; Cruz-Hernández <i>et al.</i> , 2005
<i>Penicillium rolfsii</i> (CCMB 714)	Andrade <i>et al.</i> , 2018
<i>P. crustosum</i>	Batra y Saxena, 2005
<i>P. charlesii</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
<i>P. citrinum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996

<i>P. corylophilum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
<i>P. digitatum</i>	Bradoo <i>et al.</i> , 1996
<i>P. fellutanum</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>P. glabrum</i>	Van de Lagemaat y Pyle, 2005
<i>P. glaucum</i>	Lekha y Losane, 1997
<i>P. islandicum</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>P. minioluteum</i>	Prigione <i>et al.</i> , 2018
<i>P. montanense</i>	Silva de Lima <i>et al.</i> , 2014
<i>P. notatum</i>	Ganga <i>et al.</i> , 1977
<i>P. restrictum</i>	Batra y Saxena, 2005
<i>P. spinulosum</i>	Prigione <i>et al.</i> , 2018
<i>P. variabile</i>	Batra y Saxena, 2005
<i>P. verrucosum</i>	Bhoite y Murthy, 2015
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Vattem y Shetty, 2003
<i>R. oryzae</i>	Hadi <i>et al.</i> , 1994; Purohit <i>et al.</i> , 2006
Bacterias	
<i>Achromobacter sp</i>	Lewis y Starkey, 1969
<i>Bacillus plumilus</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1984
<i>B. polymixa</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1984
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1984
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2000; Ayed y Hamdi, 2002; Kannan <i>et al.</i> , 2011
<i>L. pentosus</i>	Osawa <i>et al.</i> , 2000; Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>B. licheniformis</i>	Mondal <i>et al.</i> , 2000
<i>B. cereus</i>	Mondal <i>et al.</i> , 2001
<i>Selenomonas ruminantium</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>Citrobacter freundii</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>L. paraplantarum</i>	Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>L. acidophilus</i>	Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>L. animalis</i>	Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>L. murinus</i>	Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>L. faecalis</i>	Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>L. acidilactici</i>	Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>L. pentosaceaus</i>	Nishitani <i>et al.</i> , 2004
<i>Enterococcus faecalis</i>	Goel <i>et al.</i> , 2005
<i>L. buchneri</i>	Guzman-Lopez <i>et al.</i> , 2009
<i>L. hilgardii</i>	Guzman-Lopez <i>et al.</i> , 2009

<i>Weisella confusa</i>	Guzman-Lopez <i>et al.</i> , 2009
<i>Serratia ficaria</i>	Belur <i>et al.</i> , 2010
<i>B. sphaericus</i>	Raghuwanshi <i>et al.</i> , 2011
<i>B. massiliensis</i>	Belur <i>et al.</i> , 2012

Levaduras

<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Mahmoud <i>et al.</i> , 2017
<i>Arxula adeninivorans</i>	Boer <i>et al.</i> , 2009; Boer <i>et al.</i> , 2011
<i>C. nitratorans</i>	Kumar <i>et al.</i> , 1999
<i>Aureobasidium pullulans DBS66</i>	Banerjee y Pati, 2007
<i>C. sp.</i>	Aoki <i>et al.</i> , 1976
<i>C. utilis</i>	Shi <i>et al.</i> , 2005
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1984
<i>Mycotorula japonica</i>	Belmares <i>et al.</i> , 2004
<i>S. cerevisiae</i>	Zhong <i>et al.</i> , 2004
<i>P. adzetti</i>	Kumar <i>et al.</i> , 1999
<i>P. spp.</i>	Deschamps <i>et al.</i> , 1984

Las levaduras no-convencionales son levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* con variaciones significativas en las rutas metabólicas de degradación y síntesis, estas diferencias les otorgan características y aplicaciones diversas por lo que las investigaciones sobre estos microorganismos se han incrementado en las últimas décadas. Entre las propiedades que se han evaluado en estos microorganismos se encuentran la capacidad de asimilar distintas fuentes de carbono diferentes de los azúcares como el metanol en el caso del género *Pichia* y aceites en el caso de especies del género *Kluyveromyces*; de igual manera algunas cepas presentan osmotolerancia a altas concentraciones salinas como es en el caso de distintas cepas del género *Debaryomyces*.

2.10 Levaduras no-convencionales

Las levaduras no-convencionales son aquellas levaduras que no pertenecen al género *Saccharomyces* (González-Hernández *et al.*, 2015), en estas levaduras se han centrado las investigaciones llevadas en el grupo de investigación, ya que tienen importantes aplicaciones dentro de los procesos de fermentación. Desde la producción de etanol, hasta la obtención de metabolitos secundarios de interés médico, estos microorganismos han ganado terreno, llegando a someterlas a distintos procesos con la finalidad de poder utilizarlas como fuentes productoras de

nuevas enzimas degradativas, para el caso de nuestra investigación con la finalidad de obtener enzimas que puedan degradar los elagitaninos en medios de fermentación a nivel biorreactor.

2.11 Enzimas degradativas de elagitaninos

En la literatura se citan tres enzimas involucradas en la degradación de elagitaninos. La β -glucosidasa reportada por Vatten y Shetty (2003), para la producción de ácido elágico a partir de pomaza de arándano en cultivo en medio sólido, Mingshu *et al.* (2006), atribuyen a la enzima tanasa la degradación de elagitaninos. A su vez, Aguilera-Carbó *et al.* (2009) atribuye principalmente la degradación de los elagitaninos a la enzima elagitanino acil hidrolasa.

2.11.1 Elagitanino acil hidrolasa (elagitanasa)

La elagitanino acil hidrolasa o también conocida como elagitanasa es una enzima hidrolítica capaz de degradar elagitaninos en unidades de HHDP y glucosa. Esta enzima cuenta con un peso equivalente a 200 Da (Hernández-Rivera, 2008).

Aguilera-Carbó *et al.*, (2009), desarrollo la purificación y caracterización de esta enzima de *Aspergillus niger* GH1, en cultivo en medio sólido, utilizando espuma de poliuretano con extracto acuoso de cascara de granada, aprovechando los elagitaninos presentes en el medio como inductores. De esta investigación se reportó que la expresión de la enzima fue extracelular, en un tiempo de 48 horas, con un intervalo de pH de 4 a 6, con una temperatura óptima de 60° C. Es la única caracterización reportada hasta el momento, se desconoce el sistema enzimático asociado a la hidrólisis de los polifenoles.

2.11.2 Tanino Acil Hidrolasa (Tanasa, TAH)

La tanasa (EC. 3.1.1.20) es una enzima hidrolítica de enlaces ésteres que actúa sobre los galotaninos, elagitaninos y taninos complejos, y dado que no actúa sobre las uniones carbono-carbono, no es posible catalizar reacciones sobre los taninos condensados (Haslam y Stangroom, 1966). A su vez, la tanasa puede ser una enzima inducible o constitutiva dependiendo del organismo productor, así como de las condiciones de cultivo confiriéndole propiedades fisicoquímicas diversas. La TAH cataliza la hidrólisis del ácido tánico dando como productos nueve moléculas de ácido gálico y una de glucosa por cada molécula de sustrato. La tanasa es una glicoproteína con actividad esterasa y depsidasa. Se han encontrado tanasas con peso molecular

desde 59 hasta 300 Da (Hatamoto *et al.*, 1996) dependiendo de la fuente. Se han reportado tanasas formadas por dos o más subunidades.

La mayoría de las tanasas caracterizadas tienen su temperatura óptima de actividad entre 30° C y 40° C, pero se han reportado tanasas con temperaturas óptimas desde 20° C hasta 70° C (Ramírez-Coronel *et al.*, 2003; Battestin y Macedo, 2007; Kasieczka-Burnecka *et al.*, 2007). Todas las tanasas estudiadas tienen su máxima actividad a valores de pH ácidos (4.3 - 6.5), y son estables a pH igualmente ácido (3.0 - 7.0), con un punto isoeléctrico que va de 4.3 a 5.1 en la mayoría de los casos (Ramírez-Coronel *et al.*, 2003).

Dependiendo de la cepa y las condiciones de fermentación, la producción de la enzima tanasa se puede dar de forma constitutiva o inducida. Knudson (1913) reportó que la producción de tanasa sólo ocurre en presencia de ácido tánico, dando como productos finales de la hidrólisis, el ácido gálico y la glucosa. Posteriormente Seiji *et al.* (1973) observaron la producción de tanasa cuando el microorganismo crece solamente sobre glucosa. Por otra parte, Siegenthaler *et al.* (1997) demostraron que *Aspergillus japonicus* produce tanasa de manera constitutiva cuando crece en un medio con azúcares simples o complejos, pero que la producción de la enzima se duplicó cuando creció con ácido tánico como única fuente de carbono.

La TAH puede ser extraída de fuentes animales y vegetales, pero para su producción comercial se prefiere utilizar fuentes microbianas, ya que las enzimas producidas por microorganismos suelen ser más estables que sus análogas de origen vegetal o animal (Rodríguez-Durán *et al.*, 2010). Esta enzima ha sido determinada en microorganismos como: *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Verticillium sp*, *Penicillium chrysogenum* y *Paecilomyces variotii*, (Kasieczka-Burnecka *et al.*, 2007; Battestín y Macedo, 2007).

En levaduras no-convencionales se han reportado cepas de *Candida sp.* (Aoki *et al.*, 1976; Belmares *et al.*, 2004), *Pichia sp.* (Deschamps y Lebeault, 1984), *Debaryomyces hansenii*, (Deschamps y Lebeault, 1984), *Mycotorula japonica* (Belmares *et al.*, 2004).

2.11.3 β -glucosidasa

Las β -glucosidasas (β -D-glucosido glucohidrolasa, EC 3.2.1.21) son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces glucosídicos β (1-4) de oligosacáridos, originando como producto final monómeros de glucosa. La afinidad de esta enzima disminuye al aumentar el grado de polimerización de los oligosacáridos, siendo inactivos sobre los polímeros. Las β -glucosidasas

también disponen de actividad transferasa o transglucosidasas por lo que pueden generar productos de mayor tamaño que los oligosacáridos iniciales, lo cual determina su utilización en la biosíntesis de estos (Casablanca *et al.*, 2011).

El origen de la enzima esta reportado principalmente en hongos filamentosos como *Aspergillus oryzae* (Riou *et al.*, 1998), *Achatina áulica*, *Periconia sp.*, *Botryodiplodia theobromae*, y en bacterias aerobias como *Phanerochaete chrysosporium* (Li *et al.*, 1998), *Streptomyces sp.*, sin embargo, se han realizado algunos estudios para encontrar nuevas fuentes de esta enzima. Se ha demostrado que algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* poseen actividad β -glucosidasa (Hernández *et al.*, 2003). Este estudio se ha extendido hacia levaduras no-convencionales de los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* y *Pichia*, son productoras de β -glucosidasa, las cuales han sido reportadas con actividad intracelular y extracelular (Cordero-Otero *et al.*, 2003).

La enzima β -glucosidasa, forma parte del sistema de celulasas que está conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, las cuales hidrolizan sinérgicamente la celulosa cristalina. La celulosa, tiene una compleja estructura y gran cantidad de enlaces β -1-4, representando un reto para los procesos de hidrólisis, debido a que estará determinada por el área de contacto entre la enzima y la molécula, las dimensiones de los poros de las fibras, así como, por la cristalinidad de la molécula, (Buschle-Diller, *et al.*, 1994).

La cristalinidad de una molecula de celulosa esta determinada por los enlaces de hidrógeno intermoleculares formando una estructura fibrilar terciaria de alta cistalinidad, zona en la que las endoglucanasas hidrolizan la molecula para formar zonas amorfas, obteniendo cadenas con menor grado de polimerización. La enzima exoglucanasa β -1,4, continúa la acción de la endoglucanasa sobre la misma cadena, liberando como producto el dímero de la glucosa, que es la celobiosa. Dentro de este proceso la β -1,4 glucosidasa, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos (Lynd *et al.*, 2005).

Capítulo III. Materiales y métodos

3.1 Caracterización química de las frutillas fresa y zarzamora

3.1.1 Caracterización fisicoquímica del material seleccionado

La caracterización fisicoquímica del material vegetal consistió en la determinación por triplicado de la materia seca total, humedad, ceniza, grasa cruda, proteína, fibra cruda mediante los procedimientos descritos por la AOAC, 1996.

3.1.2 Determinación de materia seca total

En la determinación de materia seca total, se pesó 1 g de muestra húmeda en un crisol de porcelana (el cual previamente se colocó en una estufa a una temperatura de 100° C hasta obtener un peso constante), posteriormente, se incubó de 80° C por 24 h, se dejó enfriar en un desecador y se registró su peso (AOAC, 1996).

3.1.3 Determinación de humedad

La humedad se determinó a partir de los resultados obtenidos en el análisis de materia seca total.

3.1.4 Determinación de cenizas

En la determinación de cenizas se pesaron 2 g de muestra en un crisol de porcelana previamente sometido a peso constante, en una estufa a 100° C por 24 h. La muestra se carbonizó a flama de mechero en una campana y posteriormente se introdujo en una mufla a una temperatura de 500° C por 5 h (AOAC, 1996).

3.1.5 Determinación de extracto etéreo (lípidos)

Para la determinación del contenido de grasa se pesaron 5 g de muestra colocados en un dedal de celulosa e introducido a un sifón y unidos a un matraz bola fondo plano (previamente fue sometido a peso constante y adicionado con 200 ml de éter etílico). Enseguida se insertó la parte superior del sifón a un refrigerante y la muestra se puso a reflujo por 6 h a una temperatura de 80° C. Después de este tiempo, se evaporó el éter etílico contenido en el matraz, enseguida se introdujo en una estufa a temperatura de 60° C por 48 h, se enfrió en un desecador y se registró el peso (AOAC, 1996).

3.1.6 Determinación de fibra cruda

El análisis de fibra cruda consistió en 2 fases: en la primera fase, se colocaron 2 g de muestra desgrasada en un vaso de Berzelius y 100 ml de ácido sulfúrico 0.255 N. Se sometió a ebullición por 30 min y después se lavó con 100 ml de agua destilada caliente. En la segunda fase, se midió 100 ml de NaOH 0.313 N y se colocaron en el mismo vaso, enseguida, se calentó a ebullición por 30 min y se lavó con 100 ml de agua destilada caliente. La fibra obtenida se colocó en un crisol de porcelana y se introdujo en una estufa a una temperatura de 105° C por 24 h. Después de este tiempo se registró el peso del crisol y finalmente la muestra se calcinó a 500° C por 5 h en una mufla (AOAC, 1996).

3.1.7 Determinación del estado de madurez

Se siguieron los lineamientos establecidos por la NMX-F-102-S-1978. Se colocaron 10 g de muestra en 27 mL de agua y se filtró con papel filtro, posteriormente se aforó a 75 mL en un matraz con agua destilada, se tituló dicha muestra por triplicado con NaOH 0.1 N, se determinó el equivalente de los ácidos: acético, cítrico, tartárico, málico, oxálico y láctico.

3.1.8 Obtención de extractos

Se tomó y modificó la metodología propuesta por Dahham *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2008. Se pesaron 10 g de materia prima fresca y se realizó una molienda en una licuadora Oster® utilizando 100 mL de disolvente, (acetona, etanol y metanol), se dejó en reposo de acuerdo con las condiciones del diseño de experimentos y posteriormente se destiló usando el rotavapor Heidolph® serie Hei-VAP advantage.

3.1.9 Diseño de experimentos y condiciones de extracción

Se estableció e implemento un diseño de experimentos factorial 2³, con tres replicas en el punto central, utilizando como factores la temperatura de -18° C a -3° C, tiempo de reposo de 24 h a 48 h, y estado de madurez, anteriormente determinado, clasificado de verde a sobremaduro. Determinando de esta forma las condiciones de extracción para los compuestos fotoquímicos. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics® para el correspondiente análisis.

3.1.10 Contenido total fenólico

El contenido total de fenoles se realizó espectrofotométricamente descrito por Fonseca-García E. et al. (2014), Se mezcló 5 μL el extracto de la frutilla, con 45 μL del disolvente utilizado, 1500 μL de agua destilada, 500 μL el reactivo de Folin-Ciocalteu, se agito manualmente y se dejó reaccionar por 15 minutos, posteriormente se detuvo la reacción utilizando carbonato de sodio al 20% (p/v) y se dejó reposar durante una hora para después leer en el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a 625 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por 100 g de frutilla en peso fresco.

3.1.11 Contenido total de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó mediante la modificación del ensayo de Liu. *et al.*, (2011), se mezcló 200 μL el extracto de la frutilla, con 50 μL de cloruro de aluminio, se dejó reaccionar por 5 minutos, y se detuvo la reacción con 50 μL de acetato de sodio y posteriormente se agregó 2300 μL el solvente utilizado y se midió en el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a 475 nm. Los resultados fueron expresados en mg de catequina por 100 g de frutilla en peso fresco.

3.1.12 Determinaciones de la capacidad antioxidante

Dos diferentes métodos de capacidad antioxidante fueron realizados, el primero se realizó con el radical DPPH y el segundo con ABTS⁺. Los resultados fueron expresados en porcentaje de inhibición y μmol equivalentes de Trolox. Las determinaciones se realizaron de acuerdo con la metodología propuesta por Brand- Williams, Cuvelier, y Berset (1995), con algunas modificaciones. Para la determinación con el radical ABTS⁺, se calibró el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a 734 nm con etanol, se ajustó la absorbencia del ABTS⁺ diluyendo la solución stock de Trolox con etanol hasta obtener una absorbencia de entre 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Con esta solución ajustada, se colocó 990 μL para 10 μL de muestra de extracto. Las mezclas se dejaron reposar durante 5 minutos y se midió la absorbencia en el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a 734 nm. La cuantificación de la capacidad antioxidante con el radical DPPH, se calibró el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a 515 nm con metanol, se ajustó la absorbencia del DPPH entre 0.8 y 1 a la misma longitud de onda. Para ajustar la absorbencia se agregó metanol o DPPH según sea el caso. Posteriormente se agregó 2900 μL de DPPH y 100 μL

de la muestra a cada tubo de ensaye y se agito manualmente. Se dejó reposar durante 30 min en un lugar obscuro. Se mido la absorbencia el espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 a 515 nm.

3.1.13 Contenido total de elagitaninos

Siguiendo el método propuesto por Wilson-Hagerman y Lei (1990,2002), se cuantificó el contenido total de elagitaninos. Se pesaron 10 mg de muestra seca, se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 2N) , se calentaron a $70^\circ C$ por 30 horas, se filtró con papel filtro y se agregaron 9 mL de piridina, se tomó 1 mL de las disoluciones y se pasaron a tubos de ensaye donde se le adicionaron 1.1 mL de piridina y se llevaron a baño de hielo, se agregó 0.1 mL de ácido clorhídrico concentrado y se incubó en baño maría a $30^\circ C$ por 5 minutos, posteriormente se agregó 0.1 mL de nitrato de sodio al 1% y se midió en el espectrofotómetro UV- Visible PerkinElmer Lambda 35 a 538 nm, se incubó nuevamente en baño maría a $30^\circ C$ por 36 minutos y se leyó nuevamente en el espectrofotómetro a la misma longitud de onda.

3.1.14 Actividad microbica

Se esterilizó el material a utilizar, se sembró *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en dos cajas Petri con medio Mueller Hinton, se incubaron por 24 horas a $37^\circ C$. En un ambiente completamente esteril, tomar una asada de cada una de las bacterias y sembrarlas en solución salina, esto se realizó por triplicado ya que la solución debe estar entre 75 y 125×10^8 UFC con una absorbencia entre 0.8 y 1 (NMX-BB-040-SCFI-1999). Las suspensiones se leyeron a 625 nm en espectrofotómetro UV-Visible PerkinElmer Lambda 35. Ejemplo: si una suspensión contiene 78×10^8 UFC pero su absorbencia a 625 nm es 0.7, no es aceptable, se debe de inocular mas células. Por otro lado, si la suspensión contiene 120×10^8 UFC y su absorbencia a 625 nm es 0.9 entonces la suspensión si se puede aceptar para continuar con la siguiente etapa.

Con las suspensiones listas se realizó un césped con hisopos en 10 cajas Petri con medio Mueller Hinton, posteriormente se colocaron sensidiscos de papel filtro con poro mediano a los cuales se les agregó previamente extracto concentrado, antibiótico, agua, solventes, respectivamente, se incubaron durante 48 horas a $37^\circ C$.

3.1.15 Contenido de antocianinas

La cuantificación del contenido de antocianinas se lleva a cabo mediante el método de pH diferencial (Lako *et al.*, 2008). Este es un método espectrofotométrico que se basa en la transformación estructural de las antocianinas con el cambio de pH (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras). Se prepararon dos buffers, uno de cloruro de potasio (KCl) 0.2 M a pH 1 y otro de acetato de sodio (CH₃COONa) 0.2 M a pH 4.5. Cada buffer se puso en un tubo de ensaye, es decir, a un tubo el de pH 1 y a otro el de pH 4.5, y el extracto correspondiente se agregó a los dos tubos para observar la diferencia. Se tomaron lecturas de absorbencia en el espectrofotómetro de UV-Vis de cada muestra a la longitud de onda de máxima absorbencia ($\lambda_{\text{max}}=515$ nm) y a 700 nm.

3.2 Obtención de ácido elágico por degradación enzimática de elagitaninos

3.2.1 Tanasa

3.2.1.1 Cepas de levaduras no-convencionales

Se analizaron 21 cepas de levaduras-no convencionales, de las cuales se seleccionaron siete cepas, dos de las cepas de levaduras no-convencionales, como es *D. hansenii* PYC 2968, y *D. hansenii* PYC ISA 1510 provienen del Instituto Superior de Agronomía en Lisboa, Portugal. las cepas *C. utilis*, *Candida parapsilosis*, *P. kluyveri*, *Issstachenkia terricola* y *P. pastoris*, son mantenidas y conservadas en el cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia. La selección se hizo en base al screening descrito a continuación.

3.2.1.2 Screening de cepas de levaduras no-convencionales

Las cepas de levadura fueron inoculadas en medio que contiene 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02 de CaCl₂·2H₂O, 20 g L⁻¹ de glucosa, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, 30 g L⁻¹ de agar, esterilizado en autoclave Felisa modelo FE-398 a 121° C por 15 minutos. Se realizaron adaptaciones sucesivas de las cepas con concentraciones de ácido tánico de 1 a 3% (p/v), fueron incubados a 30° C por 24 horas en la incubadora KITlab modelo EK-36, se seleccionaron las cepas que crecieron en todas las concentraciones. Se utilizó un control con medio sin ácido tánico.

3.2.1.3 Condiciones de cultivo y de crecimiento de levaduras

Las cepas seleccionadas se inocularon en medio de cultivo líquido, 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02 de CaCl₂·2H₂O, 20 g L⁻¹ de

glucosa, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, 1-3% (p/v) de ácido tánico, con concentración celular inicial de 3x10⁶, posteriormente se colocaron en el Shaker SI-300R a 180 rpm, con temperatura de 30° C durante 24 horas. El tiempo de muestreo fue cada 4 horas, se utilizó un medio sin ácido tánico.

3.2.1.4 Concentración celular

Se determinó la concentración celular por conteo directo en cámara de Neubauer utilizando 100 µL del medio de fermentación y azul de metileno al 1% para la tinción de las células. La técnica fue tomada y modificada de González-Hernández *et al.*, 2015.

3.2.1.5 pH

Se tomó y modifíco la técnica de González-Hernández *et al.* (2015), la cual indica que se debe tomar una muestra de 1.5 mL cada 4 horas durante las 32 horas de desarrollo de las cinéticas de fermentación, por medio de un potenciómetro marca Hanna Instruments® se midió el potencial de hidrogeno.

3.2.1.6 Azúcares reductores

Mediante la técnica de Miller (Miller, 1959) se analizó el consumo de azúcares reductores en los tres diferentes medios. Se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se centrifugó y se retiró el sobrenadante del cual se tomaron 10 µl los cuales se mezclaron con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se llevaron a reacción a 100° C en baño maría para posteriormente llevarlos a un baño de hielo. La solución se midió en espectrofotómetro PerkinElmer Lamda® 35 a 540 nm.

3.2.1.7 Cuantificación de proteína

Se analizó la producción de proteína extracelular por la técnica de Bradford (Bradford, 1976), para la cual se tomaron 50 µL del sobrenadante obtenido por centrifugación del medio de fermentación, se hicieron reaccionar con reactivo de Bradford y se cuantificó en el espectrofotómetro PerkinElmer Lamda® 35 a 595 nm.

3.2.1.8 Determinación de la actividad enzimática de tanasa

La actividad enzimática de tanasa se determinó por dos métodos. Para la primera determinación se realizó una modificación del método descrito por Sharma *et al.*, 2000, se realizaron disoluciones del extracto enzimático en solución tampón de citratos 50 mM (pH 5,0), la misma cantidad de dicha dilución fue mezclada con un volumen igual de solución que contienen metil galato 10 mM (Sigma Aldrich) en buffer de citratos. Las mezclas se incubaron a 30° C por 5 minutos en un termobañó digital Felisa. Después de la incubación, se añadieron 300 µL de rodamina (2-tioxo-4-tiazolidiona, Sigma Aldrich) a concentración de 0.667%, se incubaron 30° C por 5 minutos, se añadió 200 µL de solución de KOH 0.5 N, se incubó por 5 minutos más a 30° C, se diluyó la mezcla con 4 mL de agua destilada. Se realizó la lectura en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 35 a 520 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando un stock de ácido gálico 0.5 mM, utilizando desde 0 a 400 µL, correspondientes a una concentración de 0 a 40 µMol/mL, se graficó µMol/mL contra absorbencia y con esa ecuación de la curva se calcularon los datos correspondientes a la actividad enzimática.

El segundo método fue tomado y modificado de la metodología descrita por Yosuke Nishitani *et al.*, 2003, se hicieron diluciones del extracto enzimático en buffer de fosfatos 40 mM (pH 5), 50 µL de la dilución se mezclaron con 5 µL de una solución que contiene metil galato 50 mM (Sigma Aldrich) en buffer de fosfatos. Las mezclas se incubaron a 37° C por 24 horas, posteriormente se mezclaron 100 µL de la mezcla con un volumen igual de solución de bicarbonato de sodio saturado. La absorbencia se leyó a 450 nm por un espectrofotómetro de microplacas Epoch®. Se realizó una curva de calibración utilizando un stock de ácido gálico 0.5 mM, utilizando desde 0 a 200 µL, correspondientes a una concentración de 0 a 500 µMol/mL, se graficó µMol/mL contra absorbencia y con esa ecuación de la curva se calcularon los datos correspondientes a la actividad enzimática.

3.2.2 β-glucosidasa

3.2.2.1 Cepas de levadura

Dos de las cepas de levaduras no-convencionales, como es *D. hansenii* PYC 2968, y *D. hansenii* PYC ISA 1510 provienen del Instituto Superior de Agronomía en Lisboa, Portugal. las cepas *C. utilis*, *Candida parapsilosis*, *P. kluyveri*, *Issstachenkia terricola* y *P. pastoris*, son

mantenidas y conservadas en el cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia.

3.2.2.2 Condiciones de cultivo de levaduras no-convencionales

Se preparó medio de cultivo que contenía 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02 de CaCl₂.2H₂O, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, como fuente de carbono glucosa 20 g L⁻¹, se esterilizo a 121° C por 15 minutos, se realizaron placas en cajas de Petri, y se inocularon las levaduras no-convencionales, se incubaron por 24 h a 32° C.

3.2.2.3 Condiciones de crecimiento de levaduras

Se realizaron cinéticas de crecimiento a 30° C, 32 horas y 180 rpm en el Shaker SI-300R, en medios con 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02 de CaCl₂.2H₂O, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, como fuente de carbono glucosa, celulosa y sacarosa como inductores de la actividad enzimática, 20 g L⁻¹, por separado, realizando mediciones cada 4 horas.

3.2.2.4 Concentración celular

Se determinó la concentración celular por conteo directo en cámara de Neubauer utilizando 100 µL del medio de fermentación y azul de metileno al 1% para la tinción de las células. La técnica fue tomada y modificada de González-Hernández *et al.*, 2015.

3.2.2.5 pH

Se tomó y modifíco la técnica de González-Hernández *et al.*, 2015, la cual indica que se debe tomar una muestra de 1.5 mL cada 4 horas durante las 32 horas de desarrollo de las cinéticas de fermentación, por medio de un potenciómetro marca Hanna Instruments® se midió el potencial de hidrogeno.

3.2.2.6 Azúcares reductores

Mediante la técnica de Miller (Miller, 1959) se analizó el consumo de azúcares reductores en los tres diferentes medios. Se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se centrifugó y se retiró el

sobrenadante del cual se tomaron 10 μL los cuales se mezclaron con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se llevaron a reacción a 100° C en baño maría para posteriormente llevarlos a un baño de hielo. La solución se midió en espectrofotómetro PerkinElmer Lamda® 35 a 540 nm.

3.2.2.7 Cuantificación de proteína

Se analizó la producción de proteína extracelular por la técnica de Bradford (Bradford, 1976), para la cual se tomaron 50 μL del sobrenadante obtenido por centrifugación del medio de fermentación, se hicieron reaccionar con reactivo de Bradford y se cuantificó en el espectrofotómetro PerkinElmer Lamda® 35 a 595 nm.

3.2.2.8 Evaluación semi-cuantitativa de la actividad celulolítica

Se inoculó una concentración celular de 1×10^7 en un medio sólido estéril con 20 g L⁻¹ Carboximetil-celulosa, 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02 de CaCl₂.2H₂O, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, incubando en un horno a 30°C por un periodo de 48 h, una vez esto, se procedió al teñido con rojo Congo al 2% asegurándose de haber lavado en seguida con NaCl 0.1M, se procedió a la adición del HCl 0.1M haciendo que cambie el contraste a un tono de negro la solución para facilitar la identificación de la actividad enzimática sobre el medio. Por último, se midió el diámetro de la actividad con un vernier (Tomado y modificado de Teather *et al.*, 1982).

3.2.2.9 Evaluación cuantitativa de la actividad β -glucosidasa

Se tomó una alícuota de 1 mL, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, del cual se utilizaron 100 μL y se mezclaron con una solución de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido en buffer de fosfatos/citratos. La mezcla se mantuvo en incubación durante una hora a 40° C en termobañero Felisa®, posteriormente la reacción se detuvo con una solución de carbonato de sodio al 20% (p/v) y se mantuvo en incubación por 30 minutos. Posterior a la incubación se midió en el espectrofotómetro PerkinElmer Lamda 35 a 400 nm, esta técnica fue tomada y modificada de González-Pambo *et al.*, (2011).

3.3 Obtención de ácido elágico a nivel biorreactor

3.3.1 Cepas de levaduras no-convencionales

Se seleccionaron tres cepas de levaduras no-convencionales de acuerdo con su capacidad de producción de las enzimas tanasa, β -glucosidasa y elagitanasa. La cepa de levadura no-convencional, *D. hansenii* PYC ISA 1510 proviene del Instituto Superior de Agronomía en Lisboa, Portugal, se seleccionó para la producción de elagitanasa, las cepas *C. utilis*, y *P. pastoris*, son mantenidas y conservadas en el cepario del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, de las cuales *C. utilis*, se seleccionó para la producción de β -glucosidasa y *P. pastoris*, para tanasa.

3.3.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de experimentos de mezclas simplex-lattice, con tres variables las cuales corresponden a las tres levaduras no-convencionales seleccionadas. Como variable de respuesta se analizó la cantidad de ácido elágico determinado por HPLC. Las corridas totales del diseño fueron 15 para cada frutilla, considerando 5 puntos centrales y los vértices, se realizó el análisis estadístico por medio del programa Statgraphics®.

3.3.4 Condiciones de cultivo y de crecimiento de levaduras

Las cepas seleccionadas se inocularon en medio de cultivo líquido, 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02 de CaCl₂.2H₂O, 20 g L⁻¹ de glucosa, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura. Una vez que las levaduras habían crecido se inoculaban en un biorreactor tipo batch marca Applikon con controlador ADI1030 de 3 L conteniendo 1.5 L del medio formulado mencionado anteriormente, adicionando elagitaninos provenientes de Fresa y Zarzamora (5 g/L). Se comenzó con concentración celular inicial de 3×10^6 realizando las corridas de acuerdo con el diseño experimental de mezclas simplex-centroide. Las cinéticas de crecimiento tuvieron 30° C, 32 horas, 180 rpm y aireación constante de 0.20 vvm. Los muestreos se realizaron en intervalos de 4 h y se analizaron los siguientes parámetros:

3.3.5 Concentración celular

Se determinó la concentración celular por conteo directo en cámara de Neubauer utilizando 100 μL del medio de fermentación y azul de metileno al 1% para la tinción de las células. La técnica fue tomada y modificada de González-Hernández *et al.*, 2015.

3.3.6 pH

Se tomó y modifíco la técnica de González-Hernández *et al.*, 2015, mediante el monitoreo de pH en tiempo real mediante electrodo Applikon conectado a la consola ADO 1030.

3.3.7 Azúcares reductores

Mediante la técnica de Miller (Miller, 1959) se analizó el consumo de azúcares reductores. Se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se centrifugó y se retiró el sobrenadante del cual se tomaron 10 μL los cuales se mezclaron con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y se llevaron a reacción a 100° C en baño maría para posteriormente llevarlos a un baño de hielo. La solución se midió en espectrofotómetro PerkinElmer Lamda® 35 a 540 nm.

3.3.8 Determinación de la cantidad de elagitaninos por método de Piridina

Se preparó la muestra con 10 μL de extracto del biorreactor y 5 blancos con 100 μL de agua desionizada. Se les agregó 2000 μL de piridina a la muestra y se colocaron en baño de hielo por 5 minutos. Después de este tiempo de añadieron 100 μL de HCl concentrado dejando pasar 5 minutos para que ocurra la reacción. Se retiró el baño de hielo y se metió a la incubadora a una temperatura de 30° C por un periodo de 5 minutos. Una vez esto, se agregaron 100 μL de Nitrito de sodio e inmediatamente se registró la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de 537nm utilizando celdas de vidrio. Finalizada la lectura se regresa la muestra al tubo y se deja pasar un tiempo de 36 minutos a 30° C. Para finalizar, se tomaron los datos de nuevo en el espectrofotómetro a una longitud de 538nm, la técnica fue tomada y modificada de Wilson y Hagerman, 1990. Para determinar la concentración se utilizó un stock de ácido elágico 10 mg/mL en metanol, el cual se puso en el ozonificador por 1 hora o hasta que estuviera disuelto, una vez que la solución fuera homogénea se colocó de 0 a 2000 μL del stock con piridina de 3000 a 1000 μL , es decir, siempre se mantuvo un volumen de 3000 μL y se leyó ineditamente en el espectrofotómetro a una longitud

de 538nm, es importante leer lo más pronto posible ya que el ácido elágico se cristaliza con facilidad.

3.3.9 Evaluación de la producción de ácido elágico por HPLC

Se tomó la base de la metodología descrita por Bala *et al.*, 2006. Se preparó la muestra con 1000 μ L de extracto enzimático proveniente del biorreactor, utilizando como fase móvil metanol grado HPLC y una solución de ácido sulfúrico a 0.05 mM en agua grado HPLC (agua ácida), con flujo de 0.8 mL/ min en gradiente 0-16 minutos: 95% (agua ácida)- 5% (metanol); 17-21 minutos: 70% (agua ácida)- 30% (metanol); 22-25 minutos: 60% (agua ácida)- 40% (metanol); 26-30 minutos: 95% (agua ácida)- 5% (metanol), con una columna CORTECS C18 2.7 μ m, en un equipo Waters e2695, en detector UV/VIS modelo 2489, con un tiempo de retención de 19 minutos. La temperatura de la muestra fue 25° C y la temperatura de la columna 50° C, las muestras se leyeron a 280 nm y 254nm.

3.4 Pruebas adicionales

3.4.1 Evaluación de la interacción entre levaduras por pruebas de competencia

Se prepararon 8 tubos con solución salina al 0.8% con las 7 levaduras seleccionadas de concentración $DO_{600nm} = 0.2$ en cada uno de ellos y un blanco que no tuvo levaduras. Una vez esto, se sembró las levaduras por dispersión en una caja Petri en medio YPD sólido compuesto de 5 g L⁻¹ MgSO₄, 1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 3 g L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.02 de CaCl₂·2H₂O, 20 g L⁻¹ de glucosa, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, se colocaron los sensibilizados estériles e inocularon con un volumen de 20 μ l de la solución salina con levaduras y el blanco. Después se incubó por un periodo de 48 h a una temperatura de 30° C, terminado esto se observó la interacción de las levaduras y se midió el diámetro del crecimiento con un vernier.

3.4.2 Evaluación de la actividad enzimática de tanasa por método de degradación de ácido tánico

Se inoculó una concentración celular de 1×10^7 en un medio sólido estéril YPD sólido compuesto de , 5 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄·7H₂O, 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 0.02 de CaCl₂·2H₂O, 20 g L⁻¹ de glucosa, 10 g L⁻¹ de peptona de caseína, 10 g L⁻¹ de extracto de levadura, modificado con ácido tánico 30 g L⁻¹, incubando en un horno a 30° C durante 48 h, una

vez que se saca la muestra de la incubadora, se midió el diámetro de la actividad enzimática con un vernier (Tomado y modificado de Barranco Valle *et al.*, 2014).

3.4.3 Determinación de proteína por método de Lowry

Se tomó 10 μL de reactivo enzimático de la muestra sacada del biorreactor y 490 μL de agua desionizada. También, se preparó el blanco con 500 μL de agua desionizada y se adiciono de 2500 μL de reactivo de Lowry. Una vez homogeneizada la mezcla se mantiene por 15 min en un lugar sin luz sobre ella, transcurrido el tiempo, se adicionaron 250 μL de reactivo de Folin Ciocalteu diluido con agua desionizada con una proporción de 3:1 y se dejó actuar por 30 min. Por último se leyeron las muestras a una longitud de onda de 550 nm y 750 nm en un espectrofotómetro PerkinElmer, modelo Lambda 35 (Tomado y modificado de Alejandro, 2009).

Capítulo IV. Resultados y discusión

5.1 Caracterización química de las frutillas fresa y zarzamora

5.1.1 Análisis bromatológico

Se realizó el análisis bromatológico y de minerales de las frutillas, en la Tabla 5, los resultados obtenidos nos dan información para la caracterización de las frutillas.

Tabla 5. Análisis bromatológico y determinación de minerales en Fresa y Zarzamora, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, n=3.

Parámetros	Zarzamora (%)	Fresa (%)	Procedimiento
	Promedio	Promedio	
HUMEDAD	79.70 \pm 0.21	57.87 \pm 2.26	NMX-FF-074-SCFI-2009 HUMEDAD Determinación de Humedad por Tratamiento Térmico
PROTEÍNA	2.03 \pm 0.10	1.22 \pm 0.07	NMX-F-608-NORMEX-2002 Alimentos-Determinación de proteínas en alimentos
GRASA TOTAL	0.42 \pm 0.03	0.32 \pm 0.02	NMX-F-615-NORMEX-2004 Alimentos-Determinación de Extracto Etéreo (Método Soxhlet)
FIBRA CRUDA	5.04 \pm 0.37	2.19 \pm 0.08	NMX-F-613-NORMEX-2003 Alimentos-Determinación de fibra cruda en alimentos
CENIZAS	3.14 \pm 0.02	6.81 \pm 0.02	NMX-F-607-NORMEX-2002 Alimentos-Determinación de cenizas en alimentos
CARBOHIDRATOS	9.67 \pm 0.18	31.60 \pm 2.30	%CTBH: 100-(H+E.E.+P.C.+C+F.C.) Valorado por la A.O.A.C (Asociación científica dedicada a la excelencia en Métodos Analíticos)

5.1.2 Determinación del estado de madurez

La madurez fisiológica de los frutos está asociada a cambios en su composición química, y pueden emplearse como indicadores de madurez satisfactorios, como es el caso de la acidez titulable, la mayoría de las frutas son particularmente ricas en ácidos orgánicos que están usualmente disueltos en la vacuola de la célula, ya sea en forma libre o combinada como sales, ésteres, glucósidos. La acidez libre representa a los ácidos orgánicos presentes que se encuentran, como su nombre lo indica libres y se mide neutralizando los jugos o extractos de frutas con una base fuerte, el pH aumenta durante la neutralización y la acidez titulable se calcula a partir de la cantidad de base necesaria para alcanzar el pH del punto final de la prueba; en la práctica se toma como un punto final pH= 8.5 usando fenolftaleína como indicador. Bajo estas condiciones, los ácidos orgánicos libres y sólo una parte del ácido fosfórico y fenoles están involucrados en el resultado final. Para reportar la acidez, se considera el ácido orgánico más abundante del producto vegetal, el cual varía dependiendo de la especie de que se trate, por lo que el resultado se expresa en términos de la cantidad del ácido dominante, como se observan en la Figura 5.

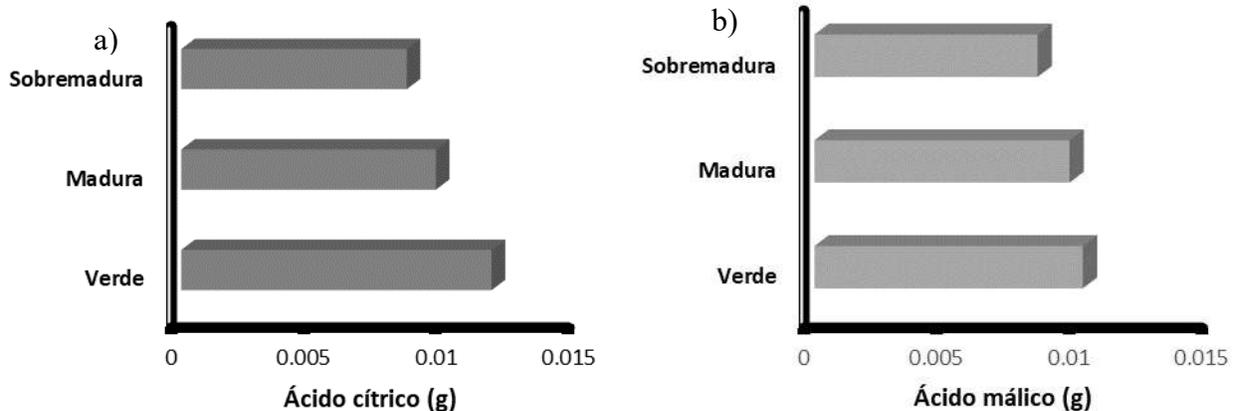


Figura 5. Determinación del estado de madurez, a) Fresa (g de ácido cítrico); b) Zarzamora (g de ácido málico).

El contenido de ácidos orgánicos libres disminuye conforme aumenta el estado de madurez, debido a que estos ácidos son utilizados como sustratos en la respiración para la síntesis de nuevos componentes durante la maduración, (Kays, 1997; Novoa *et al.*, 2006), como se observa en la Figura 5, y en la Tabla 6, en donde se presentan los resultados obtenidos expresados en mg por cada 100 gramos de frutilla fresca.

La Fresa se caracteriza por tener sabores dulces-ácidos, debido a los azúcares y ácidos orgánicos presentes, de los cuales predomina el ácido cítrico, siendo el ácido en el cual se basa la expresión de la acidez titulable para este fruto.

En un estudio realizado por Finn *et al.*, en 2011, en donde analizaron 9 variedades de Fresa, se encontraron porcentajes de acidez titulable desde el 0.50 al 1.63%, para el estado de madurez verde. Estos resultados son comparables con los datos obtenidos en esta investigación, en donde se obtuvo 1.17 % de acidez titulable. En el año 2008, Martínez-Soto *et al.*, analizaron 8 diferentes variedades de Fresa las cuales obtuvieron resultados entre 15.12 y 8.83 mg de ácido cítrico por cada 100 g de frutilla fresca, si los comparamos con los resultados obtenidos en esta investigación son muy similares como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Estado de madurez determinado por la técnica de acidez titulable, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, $n=2$.

Frutilla	Ácido	Estado de madurez		
		Verde ^a	Madura ^a	Sobremadura ^a
Zarzamora	Málico	10.1 \pm 0.49	9.6 \pm 0.42	8.4 \pm 0.35
Fresa	Cítrico	11.7 \pm 0.85	9.6 \pm 0.85	8.5 \pm 0.71

^a Expresado en mg/ 100 g de frutilla fresca

El estado de madurez de la Zarzamora es expresado en porcentajes de ácido málico, los resultados obtenidos en esta investigación corresponden al 1.01% de acidez en estado verde, hasta 0.84% en el estado sobremaduro, el cual fue comparado con la investigación realizada por Valencia y Guevara en el 2013 encontraron en la especie de Zarzamora *Rubus fruticosus L.* un porcentaje de acidez del 0.93 \pm 0.01%. En una investigación realizada en el año 2006, por Andrade Esquivel, se corroboró con distintas variedades de Zarzamora cultivadas en Michoacán que la acidez disminuye con el aumento de la madurez, esto es explicado a través de la oxidación del ácido málico a CO₂, o que puede convertir en ácido cítrico o glutámico, (Hobson, 1996; Fischer *et al.*, 2007; Novoa *et al.*, 2006).

La modificación del contenido de ácidos orgánicos durante la maduración depende directamente de las características metabólicas de la especie. La modificación del contenido de ácidos orgánicos es de gran importancia a nivel bioquímico, ya que el pH condiciona la actividad de un número considerable de enzimas asociadas a los procesos de maduración, como son el ablandamiento, color, olor, entre otros, (Kays, 1997; Novoa *et al.*, 2006).

5.1.3 Diseño de experimentos

Se estableció e implemento un diseño de experimentos factorial 2^3 , con tres replicas en el punto central, utilizando como factores la temperatura de -18°C a -3°C , tiempo de reposo de 24 a 48 horas, y estado de madurez, anteriormente determinado, clasificado de verde a sobremaduro. Determinando de esta forma las condiciones de extracción para los compuestos fotoquímicos. Se utilizó el programa estadístico Statgraphics® para el correspondiente análisis. El diseño se presenta en la Tabla 7.

Tabla 7. Diseño de experimentos factorial de dos niveles con tres factores, utilizando tres replicas en el punto central mediante el programa Statgraphics®.

Factores	Variables	Valor mínimo	Punto central	Valor máximo
A	Temperatura	-3°C ,	-10.5°C	-18°C
B	Tiempo	24 h	36 h	48 h
C	Estado de madurez	V (Verde) 1.83 ml de NaOH 0.1 N/100 g de muestra	M (Madura) 1.58 ml de NaOH 0.1 N/100 g de muestra	Sobremadura (SM) 1.33 ml de NaOH 0.1 N/100 g de muestra

Clave	Interacciones	Estado de madurez, Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), Tiempo de reposo (h)
1	c	V, -18, 48
2	Punto central	M, -10.5, 36
3	cb	V, -3, 48
4	ac	SM, -18, 48
5	a	SM, -18, 24
6	ab	SM, -3, 24
7	Punto central	M, -10.5, 36

8	Punto central	M, -10.5, 36
9	(1)	V, -18, 24
10	b	SM,-3, 24
11	abc	V,-3, 48

5.1.4 Determinación del contenido fenólico

La extracción de compuestos fenólicos está determinada por la solubilidad de estos en el solvente orgánico utilizado, esta solubilidad se ve incrementada por la polaridad del solvente. Los resultados fueron condensados en la Tabla 8, en donde se observa los tres estados de madurez en los que se realizaron los análisis para Fresa y Zarcamora. El solvente que mayor extracción llevo a cabo fue acetona, lo cual está asociado a compuestos de carácter polar, como es el caso de ácido *p*-hidroxibenzoico y el ácido ferúlico, seguido de la extracción con metanol, como el ácido eláxico, entre otros ácidos cinámicos, catequinas etc. (Paladino y Zuritz, 2011), y por último la extracción con etanol, en donde se pueden disolver fenoles como el ácido *p*-cumárico y sus derivados esterés.

Tabla 8. Contenido de fenoles en Fresa y Zarcamora, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, $n=13$.

Estado de madurez	Fresa			Zarcamora		
	Acetona ^a	Etanol ^a	Metanol ^a	Acetona ^a	Etanol ^a	Metanol ^a
Verde	270.32 \pm 0.04 ^b	199.96 \pm 0.04 ^b	275.48 \pm 0.04 ^b	603.16 \pm 0.04 ^b	235.39 \pm 0.03 ^b	256.66 \pm 0.02 ^b
	602.76 \pm 0.06 ^c	235.31 \pm 0.04 ^c	269.07 \pm 0.03 ^c	693.03 \pm 0.07 ^c	194.95 \pm 0.01 ^c	224.54 \pm 0.01 ^c
	244.82 \pm 0.18 ^d	75.68 \pm 0.04 ^d	513.70 \pm 0.04 ^d	205.50 \pm 0.05 ^c	173.87 \pm 0.02 ^d	188.81 \pm 0.03 ^d
	160.30 \pm 0.06 ^e	97.96 \pm 0.05 ^e	212.40 \pm 0.05 ^e	456.38 \pm 0.04 ^e	104.13 \pm 0.01 ^e	187.30 \pm 0.03 ^e
Sobremadura	611.03 \pm 0.07 ^b	318.08 \pm 0.07 ^b	385.56 \pm 0.04 ^b	288.30 \pm 0.07 ^b	177.15 \pm 0.07 ^b	99.87 \pm 0.02 ^b
	868.43 \pm 0.06 ^c	310.61 \pm 0.06 ^c	448.11 \pm 0.02 ^c	439.95 \pm 0.06 ^c	126.18 \pm 0.07 ^c	74.03 \pm 0.05 ^c
	326.98 \pm 0.02 ^d	164.44 \pm 0.02 ^d	282.64 \pm 0.03 ^d	252.98 \pm 0.05 ^d	179.43 \pm 0.07 ^d	114.68 \pm 0.31 ^d
	343.91 \pm 0.03 ^e	192.77 \pm 0.03 ^e	265.61 \pm 0.04 ^e	598.34 \pm 0.08 ^e	102.86 \pm 0.05 ^e	220.74 \pm 0.07 ^e
Madura	368.92 \pm 0.05 ^f	226.89 \pm 0.05 ^f	361.03 \pm 0.04 ^f	621.22 \pm 0.06 ^f	248.81 \pm 0.05 ^f	259.24 \pm 0.02 ^f

^a Datos expresados en mg de ácido gálico/ 100 gramos de frutilla fresca

^b Condición 48 h, -3° C; ^c Condición 48 h, -18° C; ^d Condición 24 h, -3° C; ^e Condición 24 h, -18° C. ^f Condición 36 h, -11° C.

El contenido de fenoles totales determinados para Fresa está influenciado, como ya se mencionó por la polaridad del solvente, teniendo mayor extracción de los compuestos con solvente acetona, además está influenciado por el estado de madurez de acuerdo con el Análisis de Varianza (ANOVA), Tabla 9, con un nivel de significancia del 95%, el aumento del estado de madurez y del tiempo de reposo, influye en la cantidad de fenoles extraídos en Fresa, como se observa en la Figura 6.

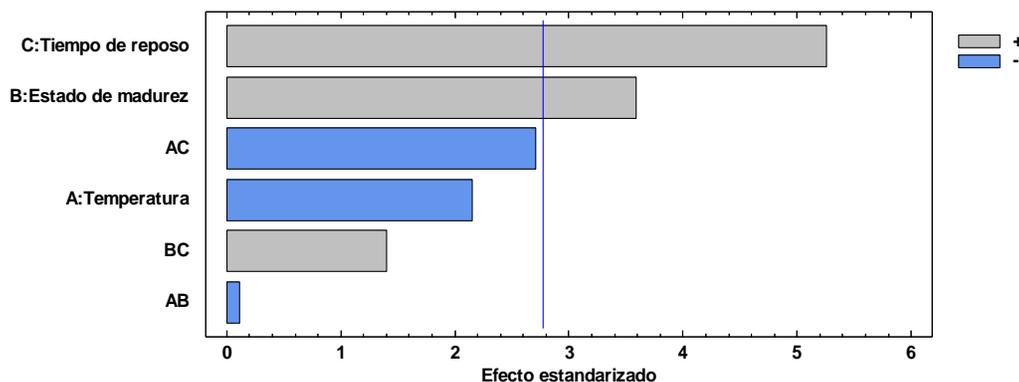


Figura 6. Diagrama de Pareto para fenoles extraídos en Fresa con solvente acetona.

El tiempo de reposo, entre mayor sea permite que se extraigan más cantidad de fenoles dado que el contacto con los fenoles será más prolongado, también se observa en los gráficos que teniendo un estado de madurez mayor se tiene mayor cantidad de fenoles, esto podría explicarse con base en la teoría que los compuestos monofenólicos (como los ácidos fenólicos y los fenilpropanoides) son intermediarios y derivados de las rutas metabólicas fenilpropanoide y shikimato. La conversión de L-fenilalanina a ácido transcinámico es el paso inicial de la ruta biosintética de fenilpropanoides, reacción que es catalizada por la fenilalaninamonialiasa (FAL), una enzima reguladora de la síntesis de fenoles (Salisbury *et al.*, 1996; Olaya y Restrepo, 2012). Esta enzima permanece activa durante las últimas etapas del crecimiento del fruto e inicios de la maduración favoreciendo la biosíntesis de estos compuestos fenólicos (Arellano Gómez *et al.*, 2005).

Tabla 9. Análisis de Varianza (ANOVA) para fenoles extraídos de Fresa con solvente acetona.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: Temperatura	34092.5	1	34092.5	4.62	0.0981
B: Estado de madurez	95079.0	1	95079.0	12.88	0.0230
C: Tiempo de reposo	203688.	1	203688.	27.60	0.0063
AB	87.1119	1	87.1119	0.01	0.9187
AC	54029.6	1	54029.6	7.32	0.0538
BC	14501.6	1	14501.6	1.96	0.2336
Error total	29523.5	4	7380.87		
Total (corr.)	431001.	10			

$R^2 = 93.15\%$; R^2 (ajustada por g.l.) = 82.875% ; Error estándar = 240.555 ; Error absoluto medio = 109.949

Debido a que la temperatura estadísticamente no tiene influencia, se determinó que la mejor temperatura para el proceso es de -18°C , ya que en los experimentos realizados se observa que es la temperatura con mayor rendimiento en el proceso de extracción, además, esta temperatura es apta para el proceso porque entre menor sea, la estabilidad de las moléculas que conforman los fenoles se van a mantener estables, sin que se degraden y el contacto con el solvente va a ser más adecuado, ya que va a disminuir la volatilidad del mismo.

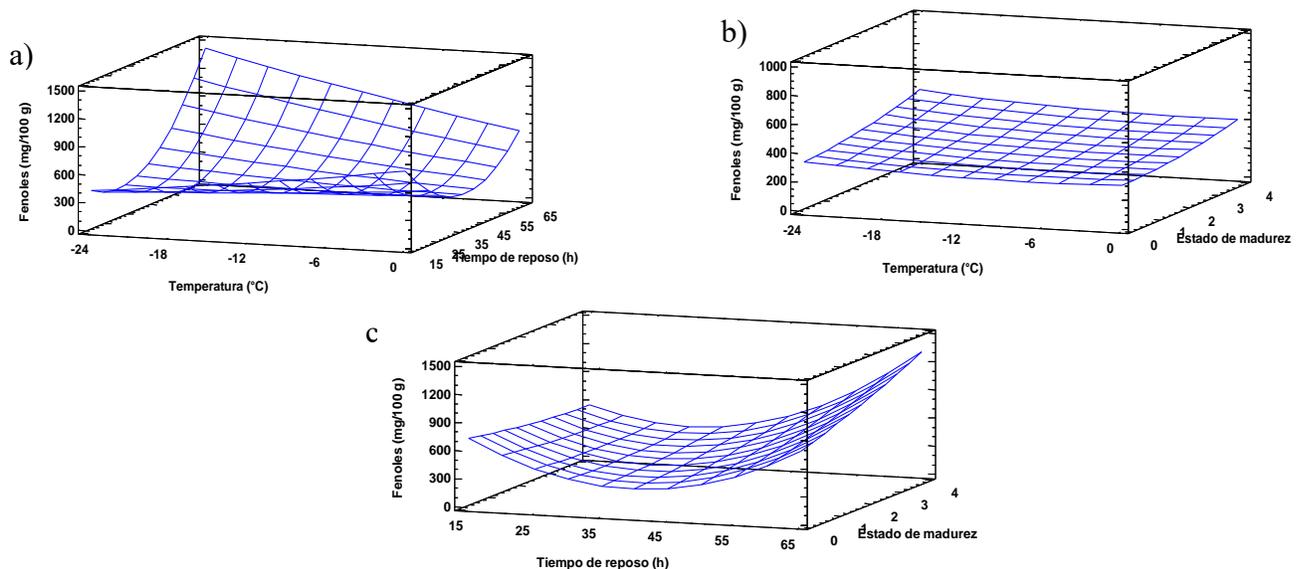


Figura 7. Superficies de respuesta para fenoles extraídos en Fresa, a) estado de madurez: maduro; b) Tiempo de reposo 36 horas; c) Temperatura -10.5°C .

Como se observa en la Figura 7, c) la relación entre el tiempo de reposo y el estado de madurez produce un aumento en la respuesta, debido al tiempo de contacto entre los fenoles y el solvente a mayor tiempo de contacto mayor extracción de estos y el estado de madurez depende de la activación de la fenilalaninaamonioliasa como ya se mencionó enzima reguladora de síntesis de fenoles en etapas maduras del fruto. En la Figura b), la relación entre temperatura y estado de madurez no son significativas en el proceso, para el inciso a) se muestra que, a mayor tiempo de reposo y menor temperatura, la extracción de fenoles se ve favorecida, ya que el tiempo de contacto es prolongado, y la temperatura les da estabilidad a los compuestos y al solvente de extracción.

La cantidad de compuestos fenólicos en Zarzamora, analizados con el programa estadístico, nos indicó que los factores analizados no tuvieron una influencia estadísticamente significativa dentro del proceso, sin embargo, al realizar el análisis en la Tabla 8, con los resultados condensados, podemos determinar que, para el caso de Zarzamora, el estado de madurez no es significativo para el proceso de extracción, ya que se obtienen valores similares en los tres estados de madurez, disminuyendo la cantidad de fenoles cuantificados, lo cual podría ser explicado por el alto metabolismo oxidativo que en esta fase favorece la aparición de especies reactivas de oxígeno singlete. Los fenoles al igual que el ácido ascórbico, actúan como antioxidantes primarios produciéndose su disminución, este comportamiento coincide con una investigación realizada por Olaya y Restrepo en el 2012 analizando diferentes estados de madurez de diferentes variedades de guayaba.

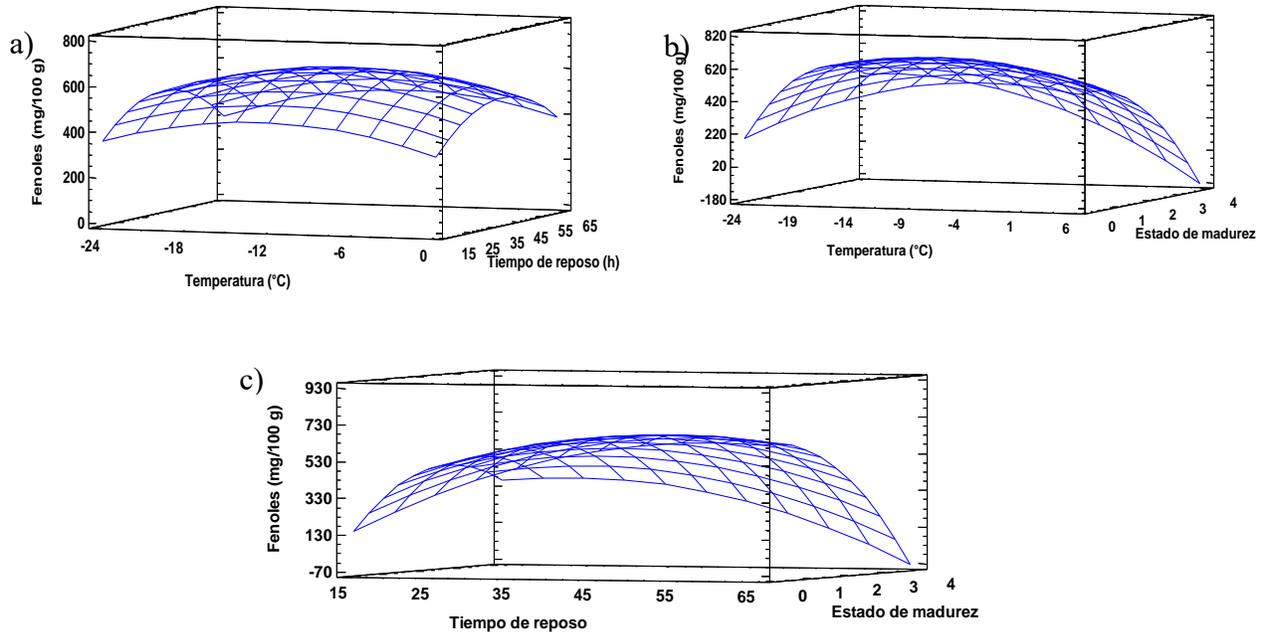


Figura 8. Superficies de respuesta para fenoles extraídos en Zarzamora, a) estado de madurez: maduro; b) Tiempo de reposo 36 horas; c) Temperatura -10.5°C .

Como se aprecia en la Figura 8 a), la temperatura en conjunto con el tiempo de reposo, la respuesta aumenta, además, como se observa en el inciso b) y c) el estado de madurez influye muy poco en el proceso de extracción, ya que el tiempo de reposo de 48 horas y la temperatura de -18°C son las variables que incrementan la respuesta, oscilando en un intervalo de 170 a 450 mg de fenoles/ 100 g de fruta fresca. Es importante destacar que el solvente más eficiente es la acetona dado que se extrajo la mayor cantidad de fenoles, esto se debe a que dentro del grupo de los fitoquímicos que contiene la zarzamora, existen compuestos polares los cuales son afines con la acetona, dado que como es un solvente muy polar, determinando que la zarzamora tiene mayor contenido como lo son ácido *p*- hidroxibenzoico y el ácido ferúlico.

5.1.5 Identificación de flavonoides

Los flavonoides son compuestos fitoquímicos relacionados con la flavona, se encuentran en frutas y vegetales, son solubles en agua, y les proporcionan los pigmentos a las plantas. Para Fresa, el contenido de flavonoides extraídos es de 600.28 mg/ 100 g de Fresa fresca en estado sobremaduro a 1333.27 mg/100 g de Fresa fresca, siendo la mayor extracción con acetona, como se observa en la Tabla 10, este contenido de flavonoides extraídos no está determinado por los estados de madurez, temperaturas o tiempos de reposo evaluados. Se observó que al utilizar acetona

como solvente la temperatura de -3°C favoreció la respuesta, así como el tiempo de reposo de 24 horas y en estado sobremaduro. Por otra parte, para etanol se favorece con una temperatura de -18°C con 48 horas de reposo y estado verde y por último con metanol la temperatura no influye, el tiempo de reposo de 48 horas y Fresa sobremadura aumenta la respuesta. Al realizar un comparativo con otras investigaciones se halló de extracción de flavonoides con Fresa que Aaby *et al.*, (2012), encontró de 70 a 670 mg/ 100 g de fruta fresca; Häkkinen y Törrönen, (2000), 50 - 140 mg/ 100 g de fruta fresca; Silva-Espinoza *et al.*, (2013), 120 -440 mg/ 100 g de fruta fresca; Kähköken *et al.*, (2001), 2000 mg/ 100g de fruta fresca.

Tabla 10. Contenido de flavonoides en Fresa y Zarzamora, los datos se expresan como el promedio \pm desviación estándar, $n=13$.

Estado de madurez	Fresa			Zarzamora		
	Acetona ^a	Etanol ^a	Metanol ^a	Acetona ^a	Etanol ^a	Metanol ^a
Verde	903.78 \pm 0.19 ^b	240.74 \pm 0.08 ^b	845.20 \pm 0.11 ^b	971.39 \pm 0.11 ^b	238.19 \pm 0.02 ^b	791.78 \pm 0.09 ^b
	442.91 \pm 0.14 ^c	326.28 \pm 0.34 ^c	972.24 \pm 0.09 ^c	1039.67 \pm 0.10 ^c	242.77 \pm 0.04 ^c	980.06 \pm 0.11 ^c
	633.43 \pm 0.10 ^d	177.84 \pm 0.19 ^d	83.61 \pm 0.03 ^d	1227.990 \pm 0.26 ^c	203.58 \pm 0.04 ^d	595.99 \pm 0.14 ^d
	641.44 \pm 0.07 ^e	255.13 \pm 0.09 ^e	41.14 \pm 0.02 ^e	1318.03 \pm 0.24 ^e	274.17 \pm 0.33 ^e	797.39 \pm 0.11 ^e
Sobremadura	1176.28 \pm 0.14 ^b	209.05 \pm 0.23 ^b	1120.70 \pm 0.11 ^b	860.16 \pm 0.10 ^b	214.05 \pm 0.18 ^b	499.50 \pm 0.00 ^b
	600.28 \pm 0.05 ^c	269.24 \pm 0.01 ^c	1012.60 \pm 0.08 ^c	969.85 \pm 0.49 ^c	231.49 \pm 0.05 ^c	829.60 \pm 0.42 ^c
	978.96 \pm 0.05 ^d	158.38 \pm 0.15 ^d	192.93 \pm 0.14 ^d	1202.14 \pm 0.23 ^d	156.99 \pm 0.03 ^d	401.35 \pm 0.12 ^d
	1333.27 \pm 0.10 ^e	176.25 \pm 0.01 ^e	199.80 \pm 0.04 ^e	974.73 \pm 0.21 ^e	223.23 \pm 0.04 ^e	69.26 \pm 0.15 ^e
Madura	1128.82 \pm 0.10 ^f	191.43 \pm 0.08 ^f	666.86 \pm 0.11 ^f	781.75 \pm 0.28 ^f	245.90 \pm 0.03 ^f	911.80 \pm 0.21 ^f

^a Datos expresados en mg de quercetina/ 100 gramos de frutilla fresca

^b Condición 48 h, -3°C ; ^c Condición 48 h, -18°C ; ^d Condición 24 h, -3°C ; ^e Condición 24 h, -18°C . ^f Condición 36 h, -11°C .

Dentro del análisis comparativo de los tres solventes de extracción utilizados para Fresa, el solvente con el que se tuvo una mejor cuantificación de Flavonoides fue la acetona los compuestos que podemos encontrar en esta determinación son flavonas, isoflavonas, flavonoles, catequinas y antocianinas, los cuales son pigmentos rojos, azules, morados y purpuras. (Moyer *et al.*, 2002). Pigmentos que también fueron encontrados en Zarzamora, para la Zarzamora, se obtuvieron valores de 860.16 mg/ g de Zarzamora fresca a 1318.03 mg/100 g de Zarzamora fresca. Se han reportado por Zhishen, *et al.*, (2008) valores de flavonoides en distintas especies, 984, 138, 153, 143, 172,

124, 183, 234, 149, 225, 125, 143, 108 mg/100 g de peso fresco, de Zarzamora, teniendo una extracción de fenoles eficiente.

De acuerdo análisis estadístico, para acetona, siendo el solvente con mayor extracción, la temperatura no influye ya que la cantidad de flavonoides determinados es muy similar para ambas temperaturas, mientras que con tiempo de reposo de 24 h y estado de madurez verde la cuantificación de flavonoides fue mayor, por otro lado con etanol y metanol el comportamiento fue muy semejante, la cuantificación de flavonoides fue favorable con temperaturas de -18°C , tiempo de reposo de 48 horas y estado de madurez verde, esto se debe a que son solventes con menor polaridad por lo que necesitan tener un tiempo de reposo más grande para tener mayor contacto con los compuestos fenólicos y temperaturas menores para darle más estabilidad a las estructuras de los flavonoides.

5.1.6 Determinación de antocianinas

Las antocianinas son un subgrupo perteneciente a los flavonoides, su característica principal es la pigmentación que abarca de colores rojos a colores morado, siendo responsables de una amplia variedad de colores atractivos y brillantes en las frutas, principalmente los frutos rojos como los arándanos, cerezas, zarzamoras, frambuesas o fresas, (Castañeda-Sánchez, *et al.*, 2015). Su molécula es inestable y susceptible a la degradación debido a los cambios de temperatura, pH y la luz. Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, constituidas por una aglicona (antocianidina) unida a un azúcar por medio de un enlace glucosídico. La estructura química básica de estas agliconas es el ion flavilio, el cual tiene la función de catión, (Badui, 2006).

Se han reportado alrededor de 635 antocianinas diferentes de las cuales seis tipos de antocianinas son las más frecuentes en plantas superiores. Como son la pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petudinina y delfinidina. De estas estructuras podemos destacar la pelargonidina, que es la responsable del color rojo, y la cianidina, que da el color magenta.

En la tabla 11, se muestran los resultados obtenidos, en donde se obtuvieron como promedio 12.90, 8.99 y 14.72 mg/ 100 g con solvente acetona, etanol y metanol, respectivamente para el caso de Fresa. Algunas otras investigaciones reportadas por Voca *et al.*, (2014) encontraron un promedio de 43.2 mg/100 g de Fresas, Debnath y Ricard en 2009, encontraron 35.1 mg/100 g de Fresas, Aaby *et al.*, 2012, de 8.5 a 65.9 mg/100 g de Fresas, Buendía *et al.*, 2010 de 20.2 a 47.4 mg /100g, lo cual muestra que se obtuvieron resultados por debajo de la esperado, lo cual puede ser determinado por condiciones de almacenamiento, tratamiento de las muestras como congelación, o exposición de los extractos a la luz por un periodo largo de tiempo.

Tabla 11. Contenido total de antocianinas en Fresa y Zarzamora, los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, $n=2$.

Estado de madurez	Fresa			Zarzamora		
	Acetona ^a	Etanol ^a	Metanol ^a	Acetona ^a	Etanol ^a	Metanol ^a
Verde	2.51 \pm 1.18 ^b	1.59 \pm 0.35 ^b	12.03 \pm 0.24 ^b	181.01 \pm 9.22 ^b	323.41 \pm 1.65 ^b	174.49 \pm 7.09 ^b
	1.84 \pm 0.47 ^c	0.75 \pm 0.35 ^c	3.68 \pm 0.24 ^c	160.45 \pm 0.95 ^c	299.51 \pm 18.44 ^c	262.07 \pm 0.95 ^c
	24.07 \pm 0.47 ^d	22.73 \pm 0.47 ^d	10.78 \pm 0.12 ^d	11.20 \pm 0.71 ^d	47.13 \pm 3.78 ^d	68.36 \pm 3.07 ^d
	28.16 \pm 0.59 ^e	18.64 \pm 1.30 ^e	6.60 \pm 0.12 ^e	16.71 \pm 0.00 ^e	39.28 \pm 1.18 ^e	99.78 \pm 0.24 ^e
Sobremadura	16.71 \pm 1.18 ^b	7.27 \pm 0.59 ^b	14.37 \pm 0.47 ^b	13.04 \pm 0.00 ^b	177.67 \pm 0.71 ^b	157.78 \pm 4.25 ^b
	20.98 \pm 0.59 ^c	6.85 \pm 0.00 ^c	22.40 \pm 0.71 ^c	125.69 \pm 4.25 ^c	196.89 \pm 6.15 ^c	96.27 \pm 0.95 ^c
	7.44 \pm 0.12 ^d	6.27 \pm 0.12 ^d	26.32 \pm 1.30 ^d	74.21 \pm 3.31 ^d	99.61 \pm 26.00 ^d	170.65 \pm 5.44 ^d
	6.43 \pm 0.35 ^e	9.78 \pm 0.83 ^e	16.71 \pm 0.71 ^e	129.20 \pm 2.60 ^e	133.04 \pm 18.91 ^e	198.89 \pm 5.20 ^e
Madura	7.97 \pm 0.95 ^f	7.05 \pm 0.91 ^f	19.58 \pm 0.20 ^f	178.39 \pm 5.52 ^f	316.73 \pm 7.64 ^f	249.03 \pm 4.10 ^f

^a Datos expresados en mg de cianidina-3-glucósido/ 100 gramos de frutilla fresca.

^b Condición 48 h, -3° C; ^c Condición 48 h, -18° C; ^d Condición 24 h, -3° C; ^e Condición 24 h, -18° C. ^f Condición 36 h, -11° C.

De acuerdo con el Análisis de Varianza (ANOVA), con un valor $p < 0.05$, las variables significativas estadísticamente es el tiempo de reposo y una interacción de tiempo de reposo con el estado de madurez. Para acetona se obtuvo una mayor cantidad de antocianinas en estado verde y tiempo de reposo de 24 horas, por otra parte, con metanol se obtuvo mayor extracción en estado de madurez sobremaduro, y tiempo de 24 horas, siendo este último solvente el que mayor afinidad presentó con los componentes para la extracción de las antocianinas, debido a que el carácter de la molécula es polar, permitiendo tener solubilidad en alcoholes, acetona y agua, siendo los más comunes metanol o etanol.

Algunas de las antocianinas determinadas en los extractos de Fresa, son cianidina 3-rutinósido, cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido, pelargonidina 3-rutinósido y pelargonidina 3-acetilglucósido, (Lopes *et al.*, 2002).

En la Zarzamora se determinó como promedio 1038.41, 225.59 y 652.97 mg/100 g, con solvente acetona, etanol, y metanol. De acuerdo con lo reportado por otros autores, se ha encontrado concentraciones de 70 mg/100 g de fruta fresca (Cerón Bonilla, 2008), 79.5 mg/100 g de fruta fresca (Yuksel y Koca, 2008), Peña-Varela *et al.*, en 2006 encontraron 40 mg/100 g de fruta fresca, lo cual nos indica que estamos por arriba de la media esperada en el proceso de

extracción. De acuerdo con el Análisis de Varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$), el tiempo de reposo de 48 horas es la variable que mayor influencia tiene en el proceso. Al realizar el comparativo entre los solventes utilizados se puede determinar que el que tuvo mayor afinidad con las antocianinas presentes en Zarzamora es el etanol, seguido del metanol. Las antocianinas que podemos encontrar en Zarzamora son derivados de la cianidina, como la cianidina-3-glucósido y la cianidina-3-rutinósido. Encontrando mayor cantidad de antocianinas en Zarzamora respecto a Fresa.

5.1.7 Determinación de elagitaninos

Los elagitaninos son polifenoles bioactivos que son abundantes en algunas frutas, nueces y semillas, como granadas, frambuesas, zarzamoras, fresas, nueces y almendras, (Amakura, 2000). Los elagitaninos pertenecen al grupo de taninos hidrolizables, los cuales producen ácido hexahidroxidifénico (HHDP), que lactoniza espontáneamente a ácido elágico. Esta reacción se ha utilizado para la cuantificación indirecta de elagitaninos, como moléculas equivalentes de la cantidad de ácido elágico presentes en el medio.

Tabla 12. Elagitaninos determinados en Fresa y Zarzamora frescas, los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, $n=3$

Frutilla	Estado de madurez		
	Verde ^a	Madura ^a	Sobremadura ^a
Fresa	226.91 \pm 5.40	148.01 \pm 24.68	128.28 \pm 25.19
Zarzamora	82.71 \pm 6.56	50.06 \pm 13.12	79.31 \pm 7.17

^a Datos expresado en mg de elagitaninos/100 g de frutilla fresca

La determinación de elagitaninos se realizó en la frutilla fresca, los resultados son expresados por triplicado, como se observa en la Figura 9 en conjunto con la Tabla 12, la mayor cantidad de elagitaninos fueron determinados en Fresa, con 128.8- 226 mg/100 g de frutilla fresca, Aaby, *et al.*, en el año 2012, reportaron 7.7-18.2 mg/ 100 g de elagitaninos en peso fresco. Häkkinen y Törrönen, (2000) cuantificaron 52.2 mg/100 g de fruta fresca; Kaponen *et al.*, (2007) determinaron, 68.3-85.3 mg/100 g; Määttä y Törrönen, (2004), 224 mg/100 g de fruta fresca; Kähkönen *et al.*, (2001), determinaron de 1 a 330 mg/100 g en peso fresco, Buendía *et al.*, 2010 de 9.67 a 22.86 mg/100 g de fresa fresca.

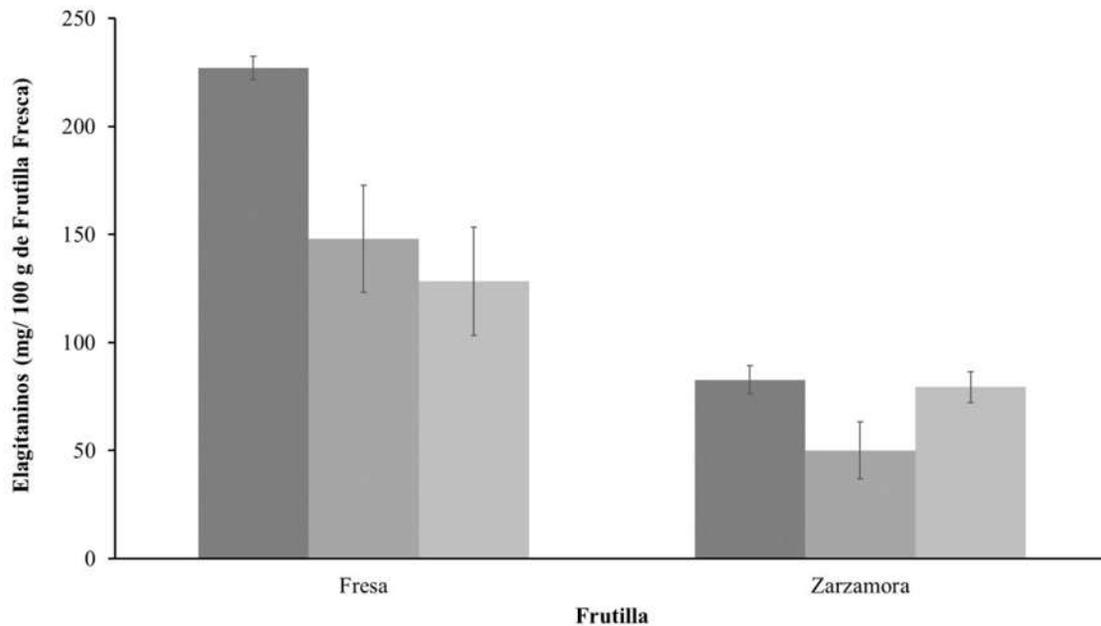


Figura 9. Cuantificación de elagitaninos en Fresa y Zarzamora frescas. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, $n=3$. Verde (■), Madura (■), Sobremadura (■).

Los elagitaninos que pueden estar presentes en la Fresa y en la Zarzamora son los denominados sanguin H-6. Kähkönen *et al.*, (2001), en su estudio se demostró que los frutos de la familia *Rosaceae*, del género *Rubus* y *Fragaria*, como es el caso de la Fresa y la Zarzamora, son los que contienen mayor contenido de elagitaninos y ácido elágico libre.

Bushman *et al.*, (2004) reportaron el contenido de elagitaninos en diferentes especies de Zarzamora, 30, 32 y 21 mg/100 g de fruta fresca. En esta investigación se obtuvieron 82.71 mg/100 g de Zarzamora fresca. Ambas frutillas presentaron mayor cantidad de elagitaninos en estado de madurez verde, lo cual es atribuido a que algunas plantas acumulan taninos, en este caso los elagitaninos, para que protejan las partes vulnerables de la planta contra el ataque o la inactivación por virus, además de que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos resistiendo el ataque microbiano y siendo recalcitrantes a la biodegradación, (Field y Lettinga, 1992).

5.1.8 Determinación de la actividad antioxidante

Los métodos más aplicados son ABTS⁺ y DPPH, ya que presentan estabilidad en ciertas condiciones, el DPPH es un radical libre que puede obtenerse sin una preparación previa, mientras

que el ABTS^+ tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química, enzimática o electroquímica, (Kuskoski *et al.*, 2003).

Los resultados la actividad antioxidante indican que los extractos de Fresa fueron capaces de atrapar los radicales DPPH y ABTS^+ , independientemente del estado de la madurez, el tiempo de reposo o la temperatura, para ABTS^+ se tuvo de 84-94 % de inhibición, y para DPPH 80-97% de inhibición, como se observa en la Figura 10.

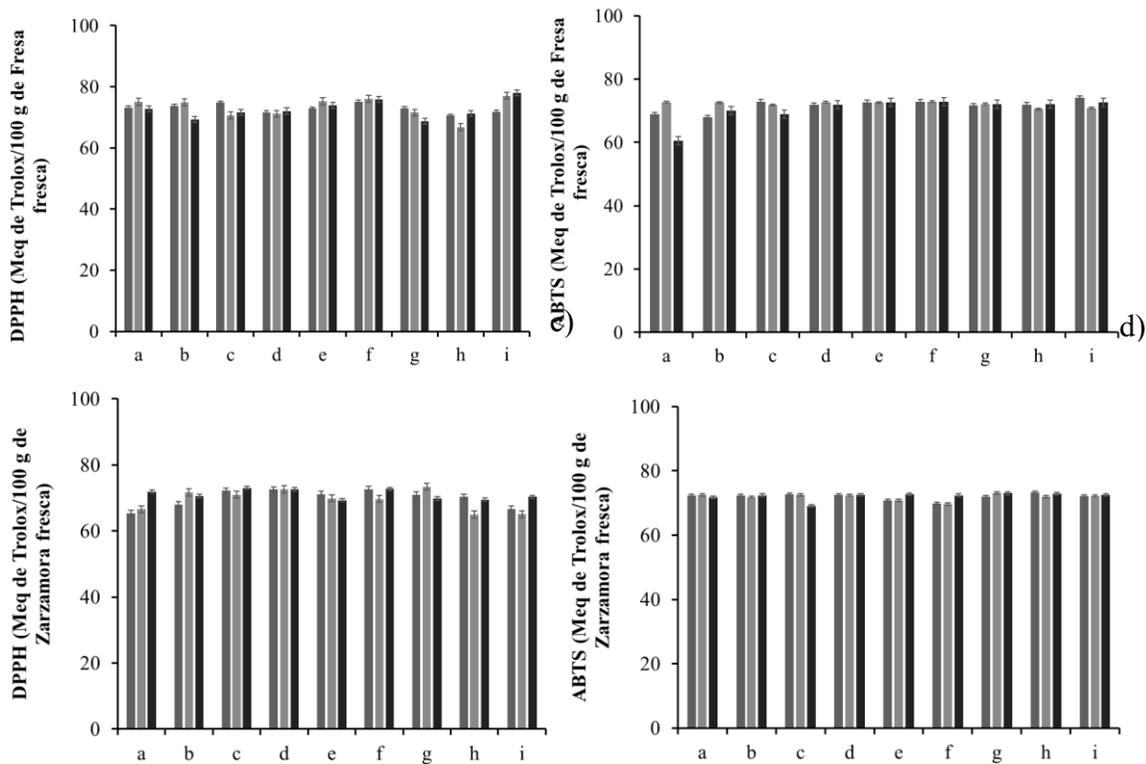


Figura 10. Determinación de actividad antioxidante, a) DPPH en Fresa; b) ABTS en Fresa; c) DPPH en Zarzamora; d) ABTS en Zarzamora. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, $n=2$. Acetona (■); Etanol (■); Metanol (■); a (Verde, 48 h, -3°C); b (Verde, 48 h, -18°C); c (Verde, 24 h, -3°C); d (Verde, 24 h, -18°C); e (Sobremadura, 48 h, -3°C); f (Sobremadura, 48 h, -18°C); g (Sobremadura, 24 h, -3°C); h (Sobremadura, 24 h, -18°C); i (Madura, 36h, -11°C).

Para Zarzamora, el porcentaje de inhibición reportado para DPPH, fue de 76-86%, y para ABTS 88-92%. Para DPPH, los factores evaluados en el proceso de extracción no tuvieron influencia sobre la actividad antioxidante, sin embargo, estadísticamente para ABTS^+ , de acuerdo al Análisis de Varianza (ANOVA), el tiempo de reposo para el solvente acetona y etanol con un

nivel de confianza del 95%, es la variable que más influye en la actividad antioxidante, además, el estado de madurez y la interacción de tiempo de reposo y estado de madurez, son los factores estadísticamente significativos, como se observa en el diagrama de Pareto en la Figura 11.

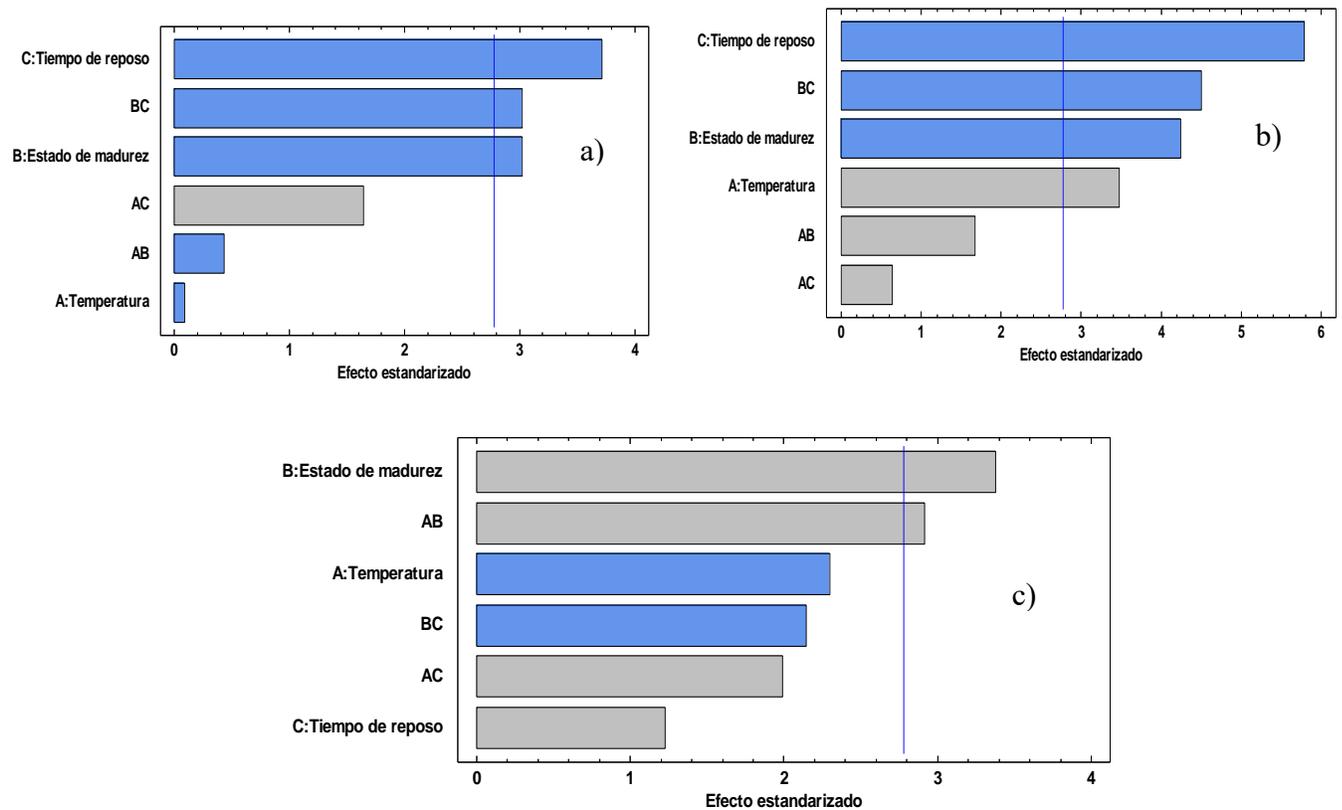


Figura 11. Diagrama de Pareto estandarizado, a) acetona; b) etanol; c) metanol.

Para el solvente metanol, en la Figura 11, el estado de madurez, la temperatura, así como la interacción entre ambos, estadísticamente son los más influyentes durante el proceso, el estado de madurez en donde se obtuvo mayor actividad antioxidante es en sobremaduro, y la temperatura de -18°C . Los compuestos que están siendo medidos por la técnica de ABTS^{+} , son de naturaleza hidrofílica y lipofílica, (Antolovich *et al.*, 2002).

Para determinar las moléculas involucradas dentro de la actividad antioxidante se realizó la cuantificación de la Vitamina C, que se muestra en la Tabla 13, debido a que es una molécula con un alto poder antioxidante que se encuentra en grandes cantidades en los frutos rojos, principalmente en la fresa.

Tabla 13. Contenido de Vitamina C en Fresa y Zarcamora, los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, $n=3$.

Frutilla	Estado de madurez		
	Verde ^a	Madura ^a	Sobremadura ^a
Fresa	47.61 \pm 0.06	78.95 \pm 0.02	94.46 \pm 0.07
Zarcamora	15.39 \pm 0.04	23.41 \pm 0.02	29.26 \pm 0.04

^a Datos expresado en mg de ácido ascórbico/ 100 g de frutilla fresca

Posteriormente se realizaron las correlaciones entre la actividad determinada en DPPH y ABTS⁺, con fenoles, flavonoides y Vitamina C. En el caso de la Fresa en donde la actividad enzimática no está determinada por el estado de madurez, o condiciones de temperatura y tiempo de reposo, se encontró que la influencia de fenoles, flavonoides y vitamina C, se mantuvieron en valores de correlación muy similares, en diferentes estadios de madurez y de solventes. Para acetona en DPPH, en estado de madurez verde la mayor correlación encontrada es de $R^2=0.66$ para Vitamina C, seguida de $R^2=0.59$ para fenoles, la cual en estado maduro una correlación similar fue encontrada para fenoles con $R^2=0.67$, y en estado sobremaduro con $R^2=0.52$, para el mismo compuesto fitoquímico, lo cual da indicio de que la actividad antioxidante es determinada del compuesto mayoritario activo en el estado de madurez correspondiente. Para acetona en ABTS, en estado de madurez verde y maduro, se encontró que la Vitamina C proporciona la mayor actividad antioxidante con $R^2=0.84$ y $R^2=0.89$, respectivamente, y para el estado sobremaduro la actividad fue proporcionada por fenoles, $R^2=0.87$. Para Zarcamora por el método de DPPH, en el caso particular del metanol, en los tres estados verde, maduro y sobremaduro, los flavonoides proporcionan la actividad antioxidante los flavonoides, con $R^2=0.91$, $R^2=0.91$, y $R^2=0.88$, respectivamente. Para ABTS, en estado verde está determinado por flavonoides con $R^2=0.80$; $R^2=0.99$ para fenoles en estado maduro, y $R^2=0.93$ para Vitamina C, en estado sobremaduro.

5.1.9 Actividad microbiciada

La actividad microbiciada para bacterias gram positivas se evaluó sobre un césped de *S. aureus*, y para bacterias gram negativas sobre *E. coli*, en donde se utilizaron 10 antibióticos diferentes, así como los extractos de Fresa y Zarcamora. Como se muestra en la Tabla 14, todos los extractos inhibieron el crecimiento de los microorganismos evaluados, se obtuvieron halos de inhibición de *S. aureus* de 7 a 11 mm con solvente acetona, de 7.5 a 20.5 mm con etanol y de 7.5

a 16 mm con metanol en utilizando Fresa; por otra parte, para Zarzamora se obtuvieron halos de 10 a 25.5 mm con acetona, 8.75 mm a 21 mm con etanol, 7.5 a 15.5 mm con metanol.

Tabla 14. Actividad antimicrobiana (diámetro de la zona de inhibición, mm) de extractos con solvente acetona, etanol, metanol. Los datos son expresados como el promedio \pm desviación estándar, $n=3$.

	Solvente	Acetona		Etanol		Metanol	
	Microorganismo / Corrida	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
F R E S A	1	9 \pm 0.0	8.5 \pm 0.07	9 \pm 0.14	11.5 \pm 0.49	9 \pm 0.14	11.5 \pm 0.07
	2	9 \pm 0.0	11 \pm 0.14	10 \pm 0.14	12 \pm 0.0	9 \pm 0.0	9 \pm 0.14
	3	8 \pm 0.0	13 \pm 0.0	7.5 \pm 0.07	8 \pm 0.0	9.5 \pm 0.35	8 \pm 0.0
	4	9.5 \pm 0.07	12.5 \pm 0.64	9.5 \pm 0.07	10.5 \pm 0.21	8 \pm 0.14	14 \pm 0.14
	5	9 \pm 0.14	10.5 \pm 0.07	20.5 \pm 0.07	14.5 \pm 0.07	9 \pm 0.14	11 \pm 0.0
	6	7.5 \pm 0.21	8.5 \pm 0.07	7.5 \pm 0.07	9 \pm 0.0	7.5 \pm 0.07	13 \pm 0.14
	7	7 \pm 0.14	9.5 \pm 0.07	9.5 \pm 0.07	11 \pm 0.14	10.5 \pm 0.21	9.5 \pm 0.49
	8	11 \pm 0.42	18.5 \pm 0.35	10 \pm 0.0	14 \pm 0.14	12 \pm 0.14	12 \pm 0.0
	9	10 \pm 0.14	13.5 \pm 0.21	7.5 \pm 0.07	21 \pm 0.28	16 \pm 0.0	10.5 \pm 0.21
	10	9 \pm 0.28	10 \pm 0.28	8.5 \pm 0.07	9.5 \pm 0.07	8 \pm 0.0	8.5 \pm 0.07
	11	8 \pm 0.14	11 \pm 0.14	9.5 \pm 0.21	8 \pm 0.14	9 \pm 0.14	9 \pm 0.0
Z A R Z A M O R A	1	14.5 \pm 0.21	11.5 \pm 0.07	21 \pm 0.4	11.5 \pm 0.21	9 \pm 0.0	16.5 \pm 0.07
	2	15 \pm 0.28	16.5 \pm 0.49	11.5 \pm 0.07	14 \pm 0.28	10.5 \pm 0.07	12 \pm 0.28
	3	13 \pm 0.14	14 \pm 0.14	12 \pm 0.0	15.5 \pm 0.35	12 \pm 0.0	13 \pm 0.0
	4	13 \pm 0.0	14 \pm 0.28	11 \pm 0.14	14.5 \pm 0.07	11 \pm 0.0	12 \pm 0.14
	5	14.5 \pm 0.07	15 \pm 0.0	10 \pm 0.14	15.5 \pm 0.07	10.5 \pm 0.07	13 \pm 0.0
	6	18.5 \pm 0.21	10.5 \pm 0.07	16 \pm 0.14	24.5 \pm 0.07	10.5 \pm 0.07	11 \pm 0.14
	7	21.5 \pm 0.49	15.5 \pm 0.07	14.5 \pm 0.07	7 \pm 0.14	11.5 \pm 0.07	7 \pm 0.0
	8	25.5 \pm 0.07	10.5 \pm 0.07	15.5 \pm 0.07	8 \pm 0.42	12.5 \pm 0.07	6.5 \pm 0.07
	9	15.5 \pm 0.07	10.5 \pm 0.07	16 \pm 0.14	14.2 \pm 0.21	15.5 \pm 0.07	12 \pm 0.14
	10	15.5 \pm 0.07	13 \pm 0.0	8.75 \pm 0.11	14.5 \pm 0.07	9 \pm 0.14	15 \pm 0.14
	11	10 \pm 0.14	13.5 \pm 0.07	19 \pm 0.14	15 \pm 0.28	7.5 \pm 0.07	10 \pm 0.28

Para *E. coli*, se presentaron halos de 8.5 a 18.5 mm para acetona, de 8 a 21 mm para etanol, de 8 a 14 mm, para metanol utilizando Fresa, (Figura 12 f). Utilizando Zarcamora, el tamaño de los halos reportados, comprendieron de 10.5 a 16.5 mm con solvente acetona, de 7 a 24.5 mm etanol y de 7 a 16.5 mm para metanol, (Figura 12. La actividad de los extractos se considera bactericida. Para ambos microorganismos los mejores halos de inhibición se presentaron en los extractos cuyo solvente fue etanol utilizando como fuente de fotoquímicos Zarcamora.

Los extractos de Fresa que inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, tuvieron un halo de inhibición que supero a antibióticos de amplio espectro como son: penicilina 10 mcg, cefalotina 30 mcg, dicloxacina 1 mcg, y de bajo espectro supero el halo de ampicilina 10 mcg, (Figura 12). Por su parte, los extractos obtenidos de Zarcamora presentaron un halo de inhibición mayor que penicilina 10 mcg, dicloxacina 1 mcg, y ampicilina 10 mcg (Figura 12).

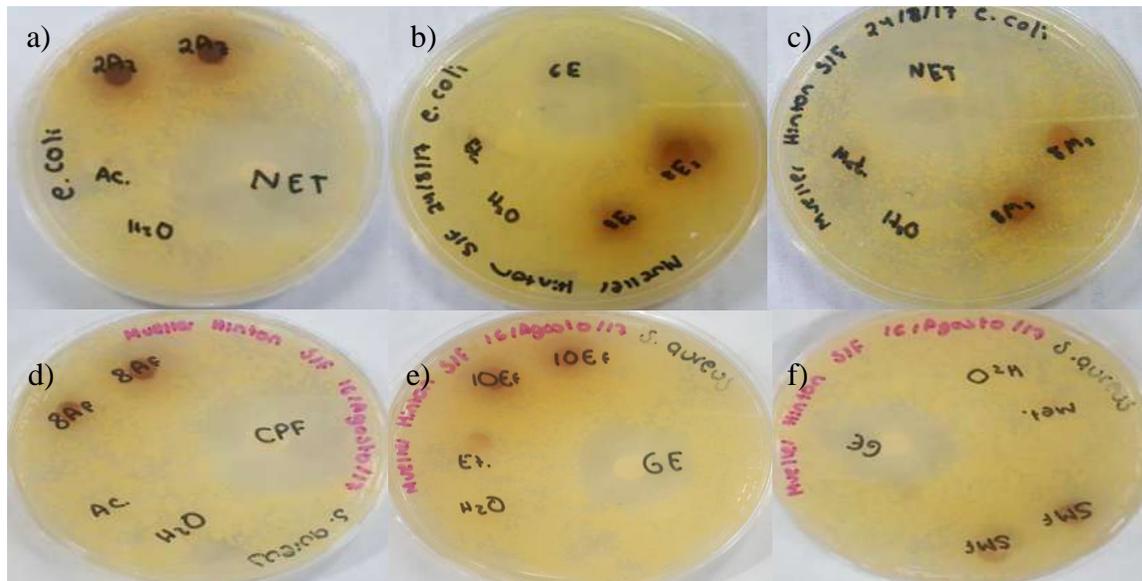


Figura 12. Halos de inhibición obtenidos con extractos de Zarcamora contra *E. coli*, utilizando tres solventes: a) Acetona, b) Etanol y c) Metanol, y halos de inhibición obtenidos con extracto de Fresa contra *S. aureus*, utilizando tres solventes: d) Acetona, e) Etanol y f) Metanol.

Para *E. coli*, los extractos de Fresa y Zarcamora inhibieron su crecimiento, además, el halo generado supero a los antibióticos como ciprofloxacina 5 mcg, ampicilina 10 mcg, y nitrofurantoina 300 mcg para ambas frutillas.

Reyes Pijallo. en el 2017 realizó un estudio en frutos rojos en donde obtuvo halos de inhibición desde 6 y hasta 19 mm, como podemos observar los halos que obtuvimos se encuentran

dentro de este intervalo y algunos superar los 19 mm, esto se atribuye a las diferentes sustancias presentes en frutos rojos (arándano, mortiño, capulí, fresas, moras, entre otras) como flavonoides, flavonas, isoflavonas, estos compuestos tienen funciones de defensa en la planta, como agentes antimicrobianos, protección contra herbívoros, radiación UV (Weiss, *et al* 2002).

5.2 Obtención de ácido elágico por degradación enzimática de elagitaninos

5.2.1 Screening de cepas de levaduras no-convencionales

Se realizaron medios de cultivo sólido YPD, de los cuales se les agregó ácido tánico a concentraciones de 1%, 2% y 3% para 15 cepas de levaduras y se evaluó su crecimiento de manera cualitativa (positivo o negativo).

Tabla 15. Screening de 15 levaduras sembradas en medio sólido de YPD, con concentraciones de 1%, 2% y 3% de ácido tánico. (+) para crecimiento positivo y (-) para crecimiento negativo, n=2.

Microorganismos	Concentraciones			
	YPD	1%	2%	3%
<i>P. pastoris</i>	+	+	+	+
<i>P. kluyveri</i>	+	+	+	+
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	+	+	+	+
<i>D. hansenii</i> (Y7426)	+	-	-	-
<i>D. hansenii</i> (ISA1507)	+	-	-	-
<i>D. hansenii</i> (ISA1508)	+	-	-	-
<i>D. hansenii</i> (ISA1509)	+	-	-	-
<i>D. hansenii</i> (ISA 1510)	+	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-	-
<i>C. utilis</i>	+	+	+	+
<i>C. shehatae</i>	+	-	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	+	+	+
<i>I. terricola</i>	+	+	+	+

De las cepas evaluadas, se han obtenido valores positivos de crecimiento sobre los cuatros medios para siete cepas de levaduras como se muestra en la tabla 15. De todas las evaluadas se observó crecimiento en las distintas concentraciones de inductor para las cepas *C. parapsilosis*, *P. kluyveri*, *C. utilis*, *D. hansenii*, *D. hansenii ISA1510*, *I. terricola* y *P. pastoris*, se observó un cambio de coloración del medio, iniciando por una coloración verde la cual fue seguida de un oscurecimiento completo producto de la degradación del ácido tánico para la formación de ácido gálico el cual es de una tonalidad verde que mediante reacciones de oxidación con el oxígeno forma galato el cual es de tonalidad marrón, esto sirvió como indicador cualitativo de la capacidad hidrolítica de taninos para las cepas evaluadas (Figura 13).

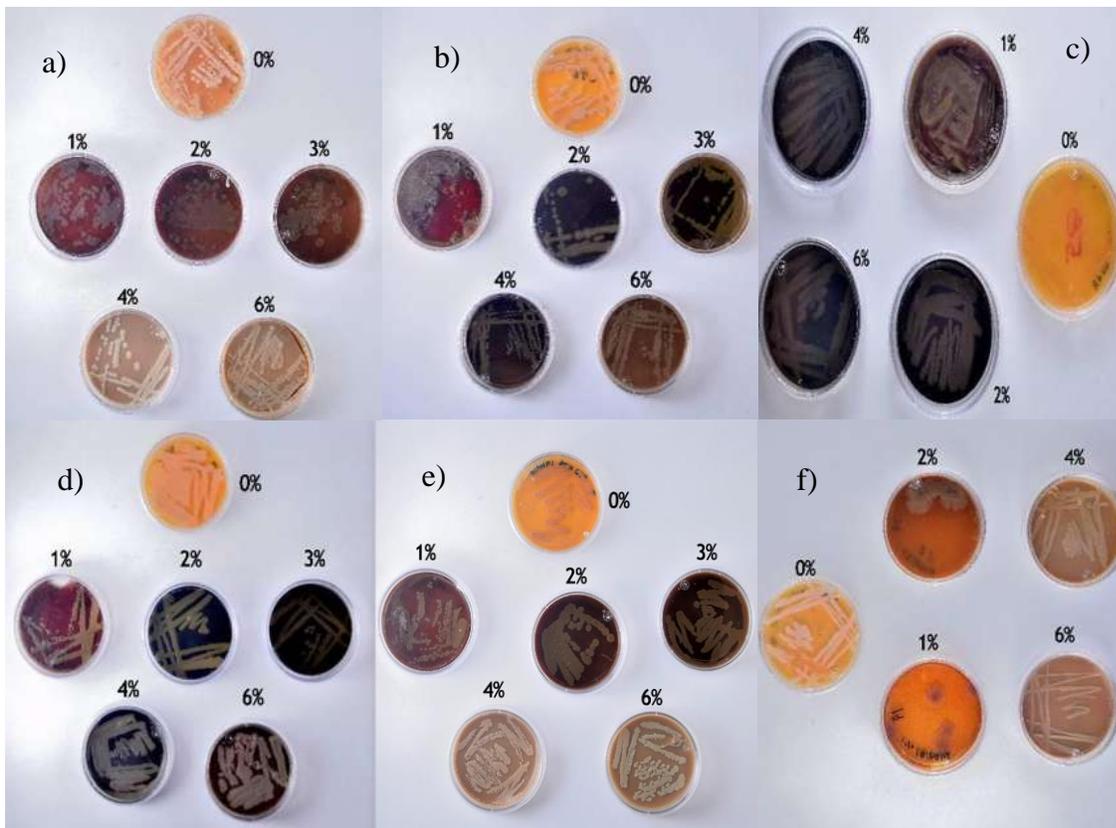


Figura 13. Cribado para la evaluación cualitativa de tanasa en las cepas: a) *C. parapsilosis*, b) *P. kluyveri*, c) *C. utilis*, d) *D. hansenii*, e) *D. hansenii ISA1510* f) *P. pastoris*, $n = 2$.

De esta manera se comprueba que dos especies del género *Candida*, dos especies del género *Debaryomyces*, dos especies del género *Pichia*, así como una especie del género *Issatchenkia*

presentan crecimiento en medios con ácido tánico que es un indicativo de posible actividad enzimática de tanasa.

5.2.2 Cinéticas de crecimiento de levaduras no-convencionales productoras de tanasa

Las cinéticas comenzaron con una concentración inicial de 3×10^6 cel/mL, y se detuvieron a las 32 horas, en donde se observó el comienzo de la fase de muerte de los microorganismos. El objetivo de las cinéticas de crecimiento es determinar las fases de crecimiento características de las levaduras.

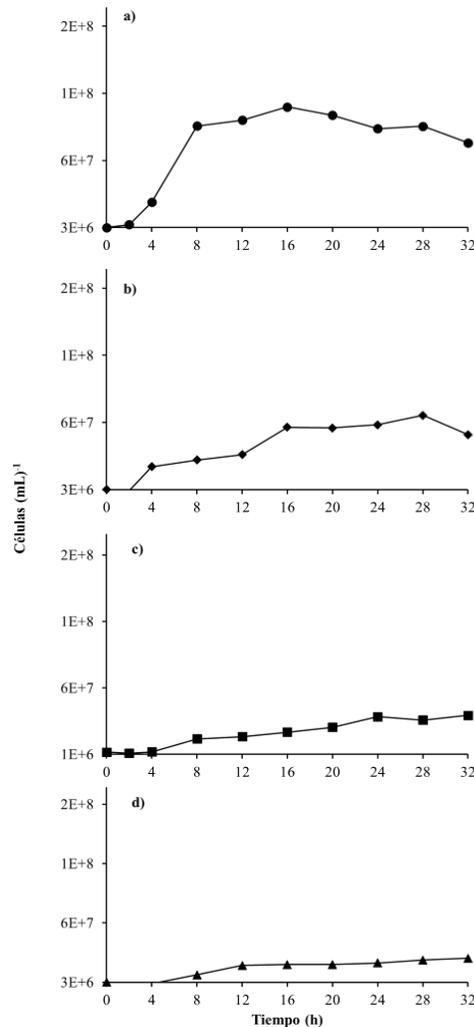


Figura 14. Cinética de crecimiento celular de *D. hansenii* PYC ISA 1510, a) YPD control (●), b) 1% de ácido tánico (◆), c) 2% de ácido tánico (■), d) 3% de ácido tánico (▲).

En la Figura 14, se muestra la cinética de crecimiento de *D. hansenii* PYC ISA 1510, en el inciso a) se muestra el crecimiento celular del medio de YPD que fue utilizado como control,

observando el inicio la fase estacionaria a la hora 8, al igual que los medios con b)1%; c) 2% y d) 3%. Se puede observar que la fase de adaptación del microorganismo es menor en la concentración de 0% o control y de 1% de inductor durando 2 horas, mientras que para 2 y % de inductor la fase de adaptación se prolongó hasta las 4 horas.

Las cinéticas de crecimiento mostraron un comportamiento típico de cepas de levaduras en donde podemos destacar la determinación de la fase estacionaria, cuya importancia de este punto radica en que durante la fase exponencial las enzimas se producen en pequeñas cantidades y se acumulan en esta fase.

Tabla 16. Tiempo de duplicación (t_D) y velocidad específica de crecimiento (μ) de las levaduras en medio YPD y en medios con concentraciones de ácido tánico (1%-3%). Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar, $n=2$.

Levadura	YPD		Ácido tánico (1%)		Ácido tánico (2%)		Ácido tánico (3%)	
	μ (h^{-1})	t_D (h)						
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	0.30 \pm 0.07	1.64 \pm 0.11	0.28 \pm 0.06	1.72 \pm 0.10	0.26 \pm 0.08	1.98 \pm 0.10	0.21 \pm 0.05	2.33 \pm 0.14
<i>C. utilis</i>	0.30 \pm 0.09	1.68 \pm 0.05	0.22 \pm 0.07	2.31 \pm 0.14	0.20 \pm 0.08	2.80 \pm 0.41	0.21 \pm 0.08	2.74 \pm 0.1
<i>C. parapsilosis</i>	0.23 \pm 0.05	2.07 \pm 0.18	0.21 \pm 0.02	2.27 \pm 0.44	0.21 \pm 0.02	2.28 \pm 0.50	0.14 \pm 0.03	3.53 \pm 0.18
<i>P. kluyveri</i>	0.21 \pm 0.00	2.38 \pm 0.68	0.17 \pm 0.02	1.77 \pm 0.18	0.15 \pm 0.02	2.03 \pm 0.30	0.12 \pm 0.01	2.08 \pm 0.5
<i>I. terricola</i>	0.24 \pm 0.00	2.09 \pm 0.57	0.26 \pm 0.04	1.20 \pm 0.16	0.25 \pm 0.06	1.36 \pm 0.33	0.24 \pm 0.09	1.74 \pm 0.6
<i>P. pastoris</i>	0.26 \pm 0.08	1.98 \pm 0.06	0.24 \pm 0.06	2.01 \pm 0.09	0.28 \pm 0.08	1.79 \pm 0.01	0.25 \pm 0.05	1.89 \pm 0.17
<i>D. hansenii</i> PYC ISA 1510	0.16 \pm 0.02	3.07 \pm 0.50	0.16 \pm 0.00	1.85 \pm 0.04	0.15 \pm 0.00	1.95 \pm 0.00	0.15 \pm 0.00	2.03 \pm 0.04

Hubo una disminución de la concentración celular conforme aumentaba la concentración de ácido tánico, sin embargo, estos datos se encuentran dentro de los valores reportados para levaduras no-convenciones como son *C. shehatae*, *C. guilliermondii*, y *S. kluyveri*, con velocidades

medias de crecimiento de $0.32 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, $0.30 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ y $0.19 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, respectivamente, (González-Hernández *et al.*, 2015).

Se aprecia que al aumentar la concentración de inductor la concentración celular disminuye, lo cual se presentó en el resto de las levaduras, por lo cual fue evaluado el tiempo de duplicación (t_D) y la velocidad específica de crecimiento (μ), que se muestra de manera comparativa en la Tabla 16 para poder comparar el comportamiento de las levaduras en medios líquidos con ácido tánico respecto al blanco.

Como se observa la velocidad media de crecimiento disminuye conforme aumenta la concentración de ácido tánico, para *D. hansenii* PYC 2968, *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *P. kluyveri*, para el caso de *I. terrícola* y *P. pastoris* la diferencia disminuye entre las concentraciones de ácido tánico y el control YPD, y por último para *D. hansenii* PYC ISA 1510, no existe diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas, lo cual no da un indicio que el sustrato fue metabolizado de mejor forma, sin embargo, el parámetro que nos da la información como indicador del metabolismo de las levaduras, siendo usado para comprobar el efecto ya sea, positivo o negativo, de un sustrato sobre los microorganismos es el tiempo de duplicación, para las cepas *D. hansenii* PYC 2968, *C. utilis*, *C. parapsilosis*, el tiempo de duplicación fue creciendo conforme aumentaba la concentración de ácido tánico, siendo un efecto positivo del mismo sobre el metabolismo del microorganismo. *P. kluyveri* e *I. terrícola* el tiempo de duplicación disminuye al aumentar la concentración de ácido tánico, indicativo de que el metabolismo de las levaduras tiene un efecto positivo para procesar el ácido tánico, y por último *D. hansenii* PYC ISA 1510 y *P. pastoris*, las cuales son levaduras que no presentan diferencia en los valores del tiempo de duplicación respecto al control, indicando que su metabolismo está procesando las moléculas de ácido tánico con mayor normalidad que las otras cepas de levadura.

5.2.3 pH de levaduras no-convencionales como productoras de enzima tanasa

La variación del pH extracelular, correspondientes a cada una de las levaduras no-convencionales en medio YPD se muestran en la Figura 15 (a). En la Figura 15 (b), se muestra los resultados del pH extracelular cuantificados en *D. hansenii* PYC 2968, con las tres concentraciones de inductor y el control, se aprecia que el ácido tánico influyó en el pH inicial de cada medio, disminuyendo conforme aumenta la concentración de este, además, el mecanismo de acidificación del medio se llevó a cabo de la misma forma que sin inductor, por lo cual se descarta que tenga un

efecto secundario sobre la membrana plasmática. Esta tendencia fue encontrada en las seis levaduras restantes.

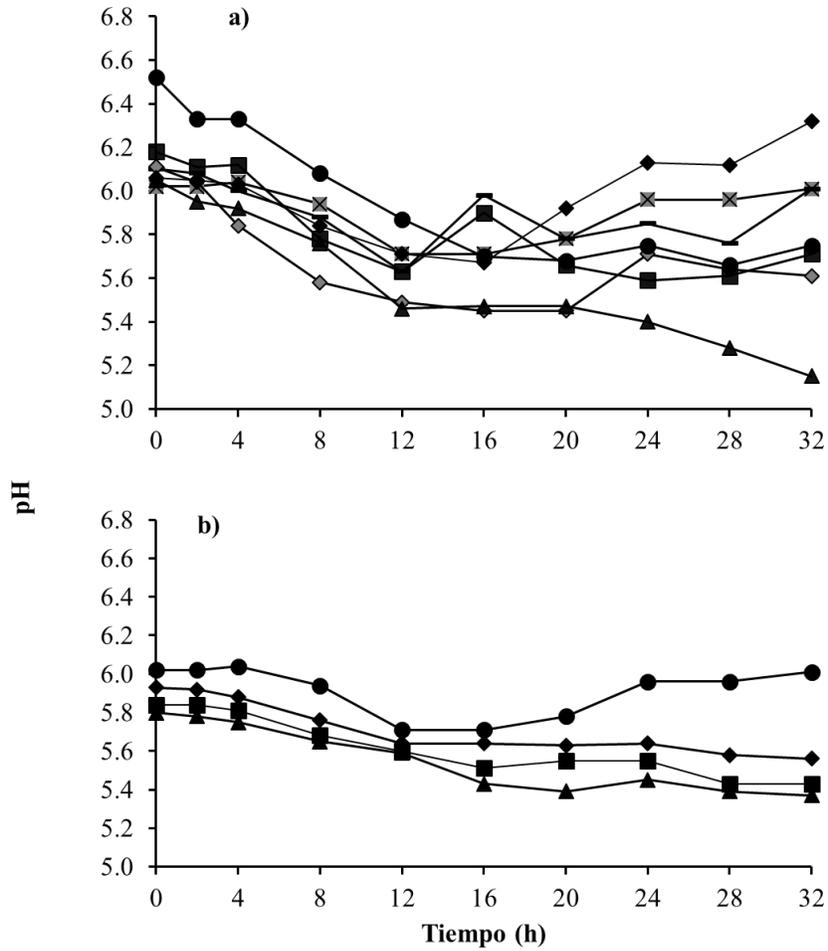


Figura 15. Cambios de pH durante las fermentaciones, (a) Medio YPD, *P. pastoris* (—x—), *D. hansenii* PYC 2968 (—◇—), *D. hansenii* PYC ISA 1510 (—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—). (b) *D. hansenii* PYC 2968, YPD control (—●—), b) 1% de ácido tánico (—◆—), c) 2% de ácido tánico (—■—), d) 3% de ácido tánico (—▲—).

Para el caso del pH durante el proceso de la fase logarítmica este comienza siendo constante, conforme avanza hacia la fase exponencial este disminuye, se vuelve a tornar casi constante en la fase estacionaria. La disminución del pH en la fase exponencial está relacionado a la actividad de la ATPasa de protones de la membrana plasmática, la cual participa en la regulación del pH interno mediante el bombeo de protones al exterior de las células (González-Hernández *et al.*, 2015). El intervalo de pH en el que se encuentra el medio para las cuatro concentraciones

diferentes es el óptimo para la tanasa, ya que se ha reportado que su máxima actividad se presenta en valores de pH ácidos (4.3 -6.5), siendo estables entre 3 y 7, con un punto isoeléctrico que va de 4.3 a 5.1, (Ramírez-Coronel *et al.*, 2003). Barthomeuf *et al.*, (1994), determino que el pH con valores menores que 3.5 la enzima es inestable, mientras que a valores por encima de 5.0 se lleva a cabo la hidrólisis del sustrato y la difusión de la enzima en el medio. Lo cual nos indica que la enzima determinada en esta investigación es extracelular, además de que no requirió un rompimiento celular para su determinación espectrofotométrica.

5.2.4 Azúcares reductores cuantificados en las cinéticas de levaduras no- convencionales productoras de tanasa

El consumo de azúcares reductor se llevó a cabo de la forma esperada en los medios de YPD y con concentración de 1% de ácido tánico para todas las levaduras,

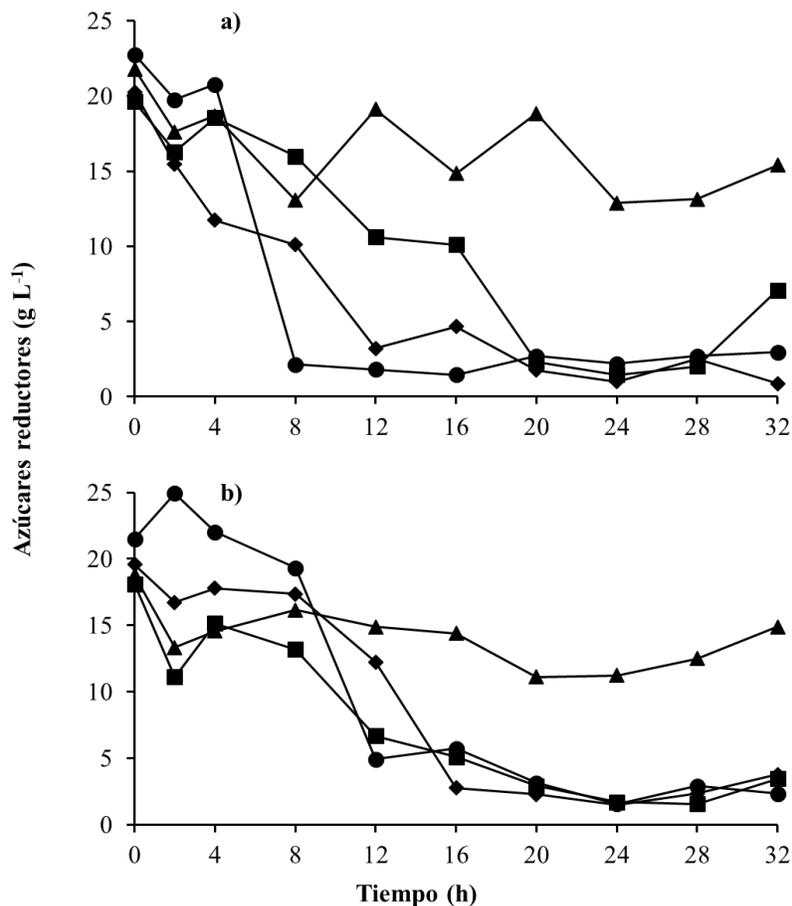


Figura 16. Consumo de azúcares reductores de las cepas: a) *D. hansenii* PYC ISA 1510 y b) *C. utilis*, YPD control (●), 1% de ácido tánico (◆), 2% de ácido tánico (■), 3% de ácido tánico (▲).

Sin embargo, se observó un comportamiento diferente para 2% de ácido tánico de la levadura *D. hansenii* ISA 1510, que se muestra en la Figura 16 a), en donde hasta la hora 20 de muestra un consumo progresivo.

Para el caso de los medios de fermentación con 3% de inductor, se puede observar en la Figura 16 b), para *C. utilis* y 3 a) *D. hansenii* ISA 1510, que no existe una disminución significativa de la glucosa presente en el medio, llegando a observar valores casi constantes que fluctúan cerca de los 15 g/L.

El comportamiento del consumo de azúcares reductores se atribuye a la reacción general de hidrólisis de la tanasa sobre la molécula de ácido tánico, en la cual da como producto nuevas moléculas de ácido gálico y una de glucosa por cada molécula de sustrato, lo cual puede explicar que no decrezca la cantidad de azúcares en el medio en las fermentaciones con mayor concentración de inductor. Doi *et al* (1973) encontró que al adicionar pequeñas cantidades (0.5%) de glucosa en el medio con ácido tánico como inductor se obtuvo mayor cantidad de tanasa extracelular. Se probaron también diferentes fuentes de nitrógeno y cuando se usó fosfato mono básico de amonio $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ se obtuvo la mayor producción de tanasa extracelular después de 40 h de cultivo (García-Peña, 1996), dichas fuentes fueron utilizadas durante esta investigación.

5.2.5 Actividad enzimática de tanasa

Como se observa en la Figura 17, para *P. pastoris*, (a) utilizando la técnica de metil galato, y (b) con la técnica de rodamina, se muestra que, al aumentar la presencia de ácido tánico en el medio, la expresión de la enzima se amplifica, siendo nula en los medios de YPD. Se puede observar que la tendencia en ambos métodos se mantiene, aumentando la actividad enzimática conforme aumenta la concentración de inductor, sin embargo, la técnica de metilgalato calcula valores de actividad enzimática menores, esto puede deberse a la estabilidad de la técnica respecto a la de rodamina. Durante esta investigación con la metodología de rodamina, la actividad enzimática comenzó alrededor de las 2 h de fermentación, conforme aumentaba la concentración de ácido tánico en el medio la actividad también aumentaba, los valores más alto se presentaron en la cepa *P. pastoris*, con 0.4934 a las 32 h, 0.6987 a las 24 h y 1.57 a las 12 h $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína para 1%, 2% y 3% de ácido tánico respectivamente, después se presentaron los valores de *D. hansenii* ISA1510 con la máxima actividad a las 12 horas de fermentación con 3% de inductor, presentando 1.1354 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, seguido de 0.9829 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína a las

16 horas con 2% de inductor, y por ultimo 0.3559 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína con 1% de ácido tánico. Para *C. parapsilosis* se obtuvieron valores de 1.2596 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína con 12 horas de fermentación con 3% de ácido tánico, a las 32 horas de fermentación con 2% de inductor se obtuvo 0.7662 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, los máximos valores de actividad enzimática que presentó *D. hansenii* PYC 2968 para 1%, 2% y 3% de ácido tánico fueron 0.3342, 0.7100 y 1.0528 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, respectivamente con 24 horas de fermentación para los 3 casos. *C. utilis* obtuvo 1, 0.5848 y 0.2780 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, para los medios con 1%, 2% y 3%, respectivamente con 28 horas de fermentación.

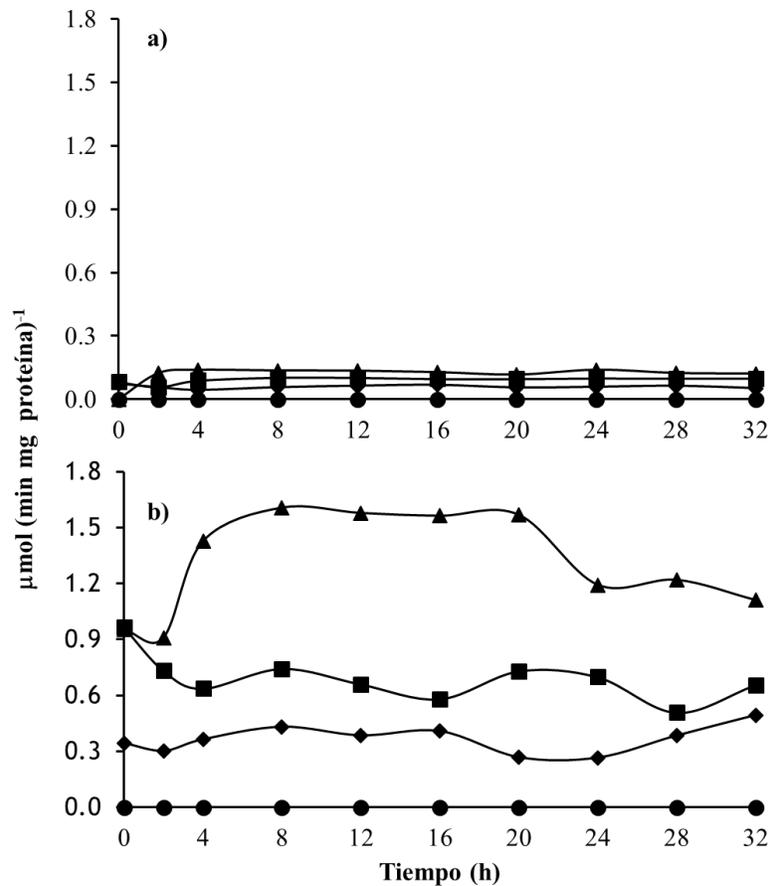


Figura 17. Actividad enzimática de tanasa para la levadura *P. pastoris*, a) método de metil galato; b) rodamina. YPD control (●), 1% de ácido tánico (◆), 2% de ácido tánico (■), 3% de ácido tánico (▲).

P. kluyveri con 28 horas de fermentación, para fermentaciones con 1%, 2% y 3% de inductor, 0.9220, 0.9330 y 0.9805 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, respectivamente, y por último fueron

los valores obtenidos utilizando *I. terrícola* con 0.8251 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína con 1% de inductor con 28 horas de fermentación, 0.6142 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína con 2% de ácido con 28 horas, y 0.7559 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína con 3% de inductor y 32 horas de fermentación.

En la figura 18, se presenta un gráfico de barras con la finalidad de comparar la actividad enzimática de las 7 levaduras utilizando los dos métodos espectrofotométricos, a) rodamina y b) metil galato, los datos están expresados como el promedio de las 10 mediciones realizadas a lo largo de la cinética, determinando con metil galato que las levaduras con mayor actividad enzimática son: *D. hansenii* PYC 2968, *D. hansenii* PYC ISA1510 y *C. parapsilosis*, mientras que *P. kluyveri* e *I. terrícola*, tuvieron la menor actividad. Para la técnica con rodamina, los valores obtenidos son de magnitud mayor, indicando que el método tiene mayor estabilidad, destacando *D. hansenii* PYC ISA1510, *P. pastoris* y *C. parapsilosis*, al igual que con metil galato *P. kluyveri* e *I. terrícola*, tuvieron la menor actividad.

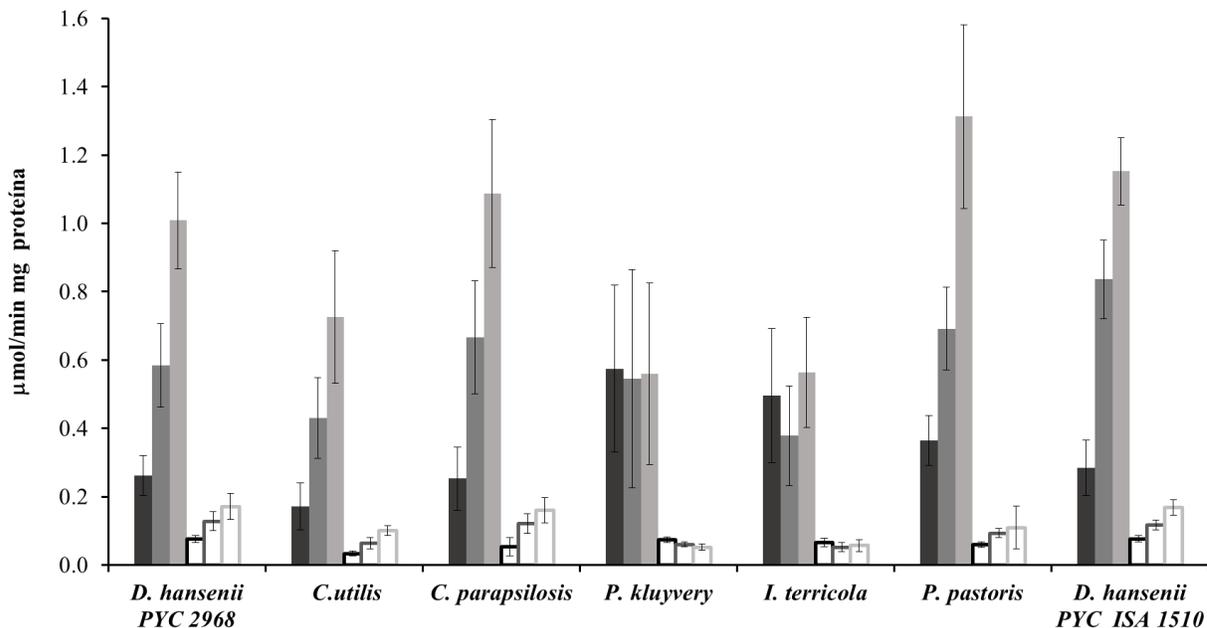


Figura 18. Comparación de los métodos de la actividad enzimática de tanasa determinada con: a) rodamina: 1% de ácido tánico (■), 2% de ácido tánico (■), 3% de ácido tánico (■); b) metil galato: 1% de ácido tánico (□), 2% de ácido tánico (□), 3% de ácido tánico (□).

La generación de glucosa y ácido gálico por medio de la hidrólisis fue la base para la determinación de la actividad enzimática, el primer método con rodamina reacciona con el ácido

gálico presente en el medio formando un compuesto de color rosado, siendo estable después de su formación por al menos 40 minutos, independientemente de la concentración de ácido gálico, (Sharma *et al.*, 2000). El segundo método, detecta el ácido gálico producto del de la ruptura del enlace entre la molécula del ácido y el radical metil, que conforman el metil galato, formando un complejo de color naranja fácilmente degradable.

En los noventas se le atribuía principalmente la producción de la enzima tanasa las especies fúngicas, a partir del año 2000 se comenzaron los estudios demostrando que la producción de la enzima también se llevaba a cabo por bacterias y levaduras. De la misma forma se determinó que, dependiendo del microorganismo y de las condiciones de fermentación es producida de manera inducible o constitutiva. Los mecanismos de inducción y represión no están claros y existe cierta controversia acerca del papel que juegan algunos compuestos en su regulación (Aguilar *et al.*, 2001; 2001^a). Knudson (1913) reportó que la producción de tanasa sólo ocurre en presencia de ácido tánico, dando como productos finales de la hidrólisis, el ácido gálico y la glucosa. Posteriormente Seiji *et al.*, (1973) observaron la producción de tanasa cuando el microorganismo crece solamente sobre glucosa. Por otra parte, Siegenthaler *et al.*, (1997) demostraron que *Aspergillus japonicus* produce tanasa de manera constitutiva cuando crece en un medio con azúcares simples o complejos, pero que la producción de la enzima se duplicó cuando creció con ácido tánico como única fuente de carbono. Comparando los resultados con investigaciones previas se encontró que para bacterias *Lactobacillus plantarum* de las cepas ATCC14917, CNRZ 184, y 61 D, se reportaron actividades de tanasa de 0.0057 ± 0.0002 , 0.0008 ± 0.0001 , < 0.0001 U/mL, respectivamente, (Nishitani y Osawa, 2003); para especies fúngicas como *Aspergillus* cepa Aa20 se han reportado de 0.62 a 1.30 U/mL, (García-Peña, 2006). La cepa *Aspergillus sp. GM4* presentó valores de actividad enzimática de 0.13 ± 0.04 a 1.44 ± 0.43 U/mg de proteína, (Souza *et al.*, 2015). Shi *et al.*, 2005, encontraron actividad de tanasa en la cepa *C. utilis* con valores de 32 U/cm³ con 9 días de fermentación. Zhong *et al.*, (2004) clonaron y expresaron el gen de tanasa proveniente de *A. oryzae* en la levadura *P. pastoris*, obteniendo cantidades de 7000 U/L de tanasa extracelular con 96 h de fermentación. Se puede observar que la actividad en las bacterias antes mencionadas es menor a la que se determinó durante esta investigación, los valores obtenidos en las fermentaciones con *Aspergillus* cepa Aa20 y *Aspergillus sp. GM4*, son similares a los que se obtuvieron con *P. pastoris* y *D. hansenii ISA1510* y los valores obtenidos en *C. utilis* con 9 días de fermentación haciendo una extrapolación de los datos se podría llegar a esos valores al aumentar el tiempo de proceso.

De acuerdo con la investigación realizada por Beverini y Metche en 1990, determinaron que la actividad de la enzima tanasa se lleva a cabo de dos formas: despolimerasa y esterasa, en el primer caso actúa sobre el enlace éster entre la glucosa y el ácido gálico dando como productos glucosa, ácido gálico y algunos intermediarios. En el segundo caso, actúa sobre el enlace ester del ácido tánico metilado, obteniendo ácido tánico y metanol. Las pruebas con rodamina que detecta la presencia de ácido gálico y la constante presencia de glucosa en los medios de fermentación determinados por DNS, nos indican que la enzima tanasa producida por las levaduras es despolimerasa. La tanasa es una enzima inducible (Doi *et al*, 1973, Beverini y Metche, 1990), y completamente extracelular. (Lenkha y Lonsane,1994; Chatterjee *et al*, 1996).

5.2.6 Evaluación semi-cuantitativa de la actividad celulolítica

Teather y Wood en 1982, observaron que el rojo congo podía ser usado en los ensayos para evidenciar la hidrólisis de polisacáridos debido a que el colorante forma complejos con las moléculas aún no hidrolizadas, facilitando la diferenciación entre microorganismos celulolíticos y no celulolíticos por la formación de zonas de aclaramiento alrededor de las colonias. Para esta técnica se utiliza como indicador, la degradación del colorante rojo congo, debido a que este es adsorbido sólo por largas cadenas de polisacáridos, formando un halo de degradación de color blanco alrededor de la colonia, característico de este tipo de enzimas, (Pointing, 1999; Zhang *et al.*, 2006).

Dicha coloración fue observada en los cultivos realizados en medios con rojo Congo, figura no mostrada, la secreción de enzimas celulolíticas generaron zonas de color blanco, en mayor medida fueron las cepas *C. parapsilosis* y *P. kluyveri* seguidas de *D. hansenii* PYC ISA 1510, *I. terrícola* y *C. utilis*, sin embargo, no es fiable este resultado debido a que la zona difícilmente puede ser medida porque la levadura está sembrada de forma estriada, (Figura 19).

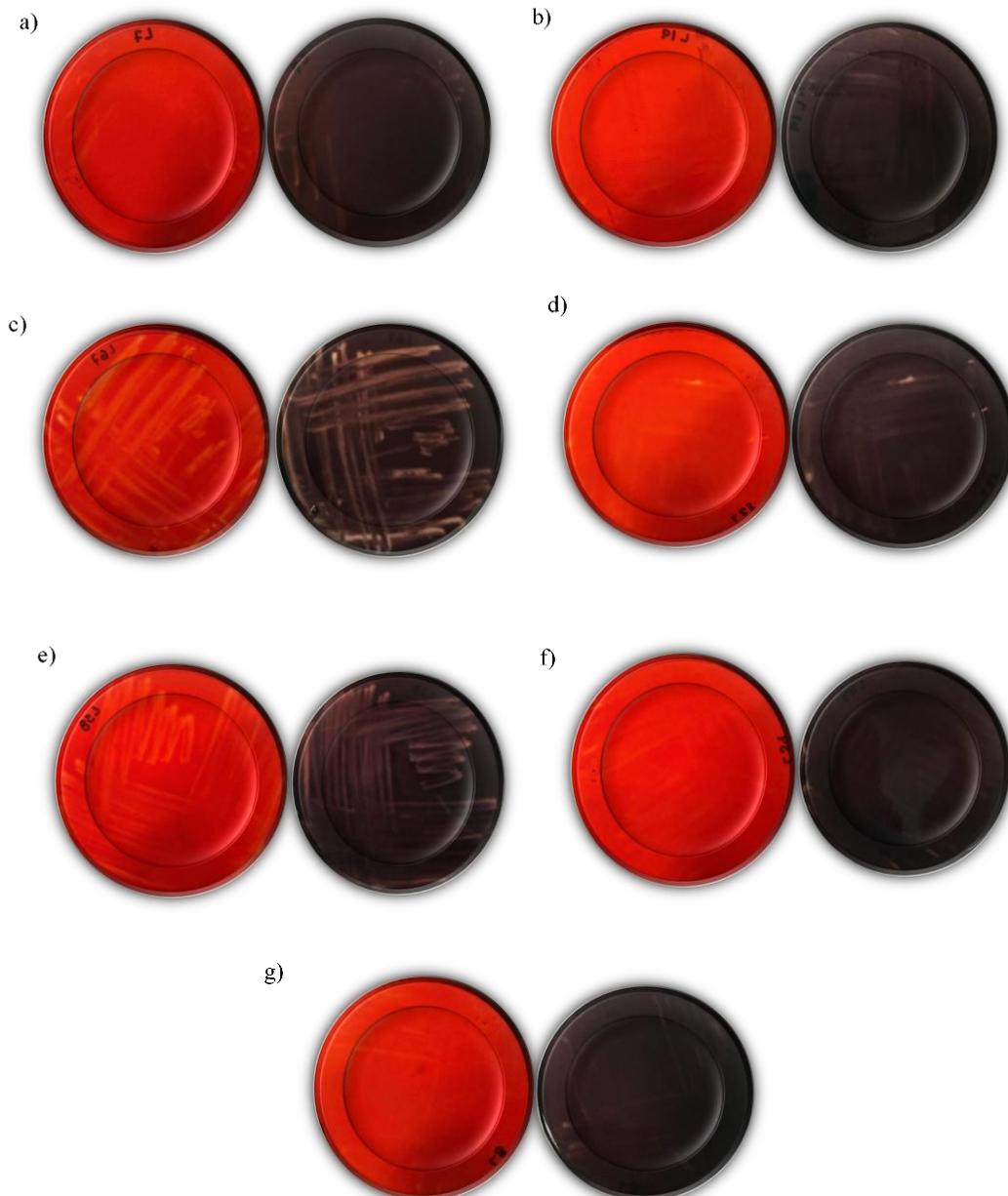


Figura 19. Prueba semi-cuantitativa Rojo Congo. a) *P. pastoris*, b) *D. hansenii* ISA1510, c) *C. parapsilosis*, d) *C. utilis*, e) *P. kluyveri*, f) *I. terrícola*, g) *D. hansenii* PYC 2968.

Por lo cual se realizó la inoculación de las levaduras en el centro, se muestra en la Figura 20, utilizando una concentración inicial de 1×10^7 cel/mL, para obtener un halo indicando la degradación del polímero, y que sea medible, los resultados obtenidos indicaron que la mejor actividad celulolítica la presentó *I. terrícola* con $9.60 \text{ mm} \pm 0.04$, seguida de *P. kluyveri*, *C. parapsilosis*, y *C. utilis*, con 9.20 ± 0.05 , 8.67 ± 0.03 y $8.57 \text{ mm} \pm 0.04$, respectivamente.

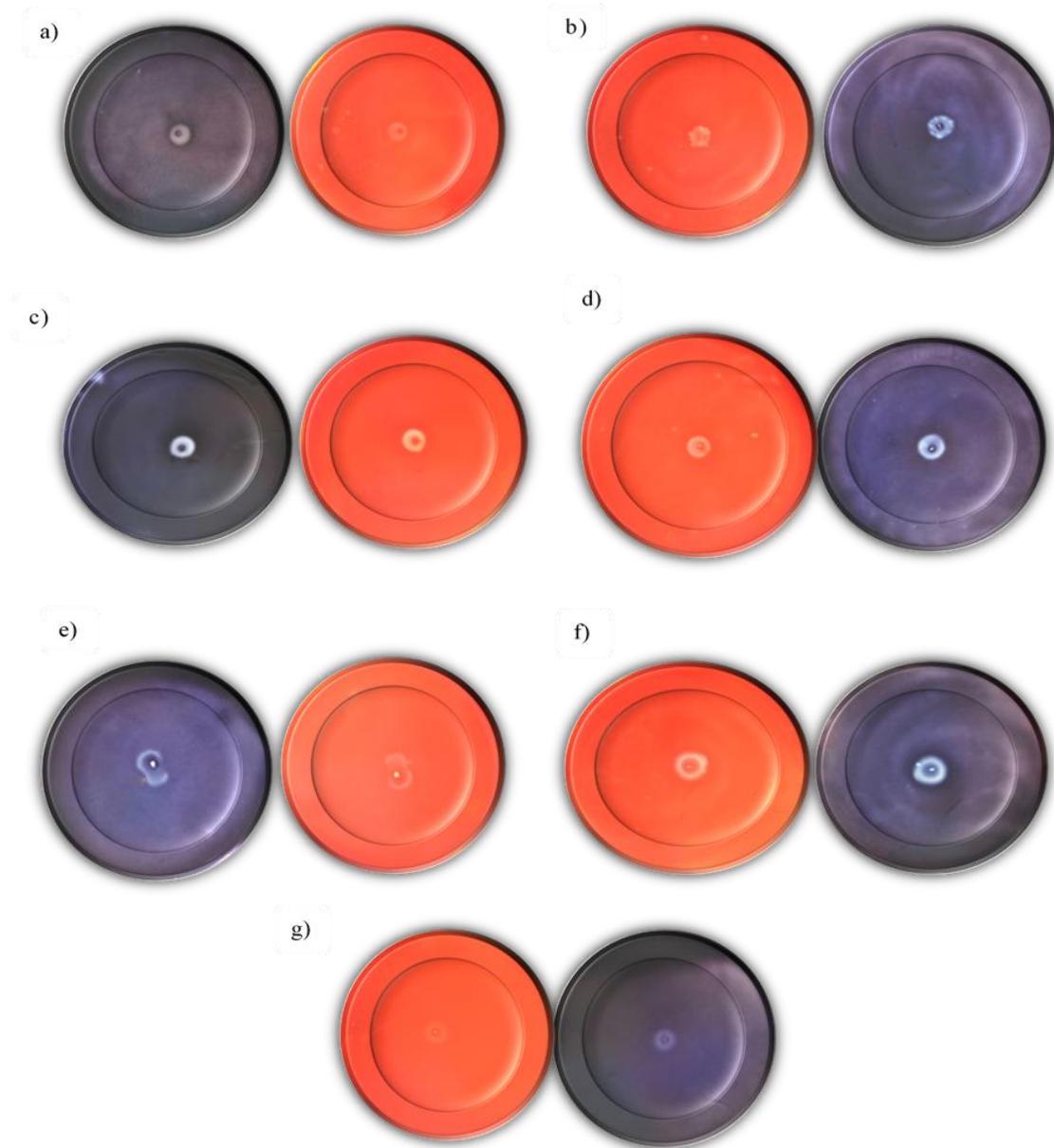


Figura 20. Halo de degradación utilizando la técnica de Rojo Congo. a) *P. pastoris*, b) *D. hansenii* ISA1510, c) *C. parapsilosis*, d) *C. utilis*, e) *P. kluyveri*, f) *I. terricola*, g) *D. hansenii* PYC 2968.

Durante las 48 horas de incubación se observó *C. parapsilosis*, y *C. utilis*, crecieron en menor tiempo respecto a las 6 levaduras restantes, siendo un indicio de la mejor adaptación de las cepas debido a la actividad enzimática inducida, destacando que esta técnica solo es un método

semi-cuantitativo, que nos apoya a tener un panorama relativo sobre las levaduras que pueden tener mejor actividad enzimática.

Los resultados obtenidos en la investigación hecha por Lu *et al.*, 2005, reportaron halos de degradación de 6.4 cm para bacterias mesófilas obtenidas de tallos de flores, y en esta investigación se obtiene aproximadamente el 15% comparados con bacterias degradadoras de celulosa. Sin embargo, halos de degradación de 0.2, 0.3 y 0.35 mm fueron reportados por Gaitan *et al.*, 2007, para bacterias degradadoras de celulosa aisladas de un cultivo de *Dendranthema grandiflora*, da la pauta a considerar que a pesar de los hongos levaduriformes no se encuentran reportados con actividad celulolítica, pueden metabolizar cadenas complejas de carbohidratos, llegando a ser comparables con algunas cepas específicas degradadoras de celulosa.

5.2.7 Cinéticas de crecimiento de levaduras no-covencionales productoras de β -glucosidasa

Se observó que el metabolismo de las levaduras analizadas se aceleró al utilizar glucosa como fuente de carbono, siendo un sustrato apto para su crecimiento, el cual fue corroborado con la breve duración de la fase exponencial, por su parte la fase de adaptación para la levadura *I. terricola* fue menor en comparación con el resto de las levaduras. La fase estacionaria se presentó de manera general alrededor de la hora 12 con excepción de las cepas *D. hansenii* PYC ISA 1510 e *I. terricola*, la cual se mostró en la hora 8, como se observa en la Figura 21 a.

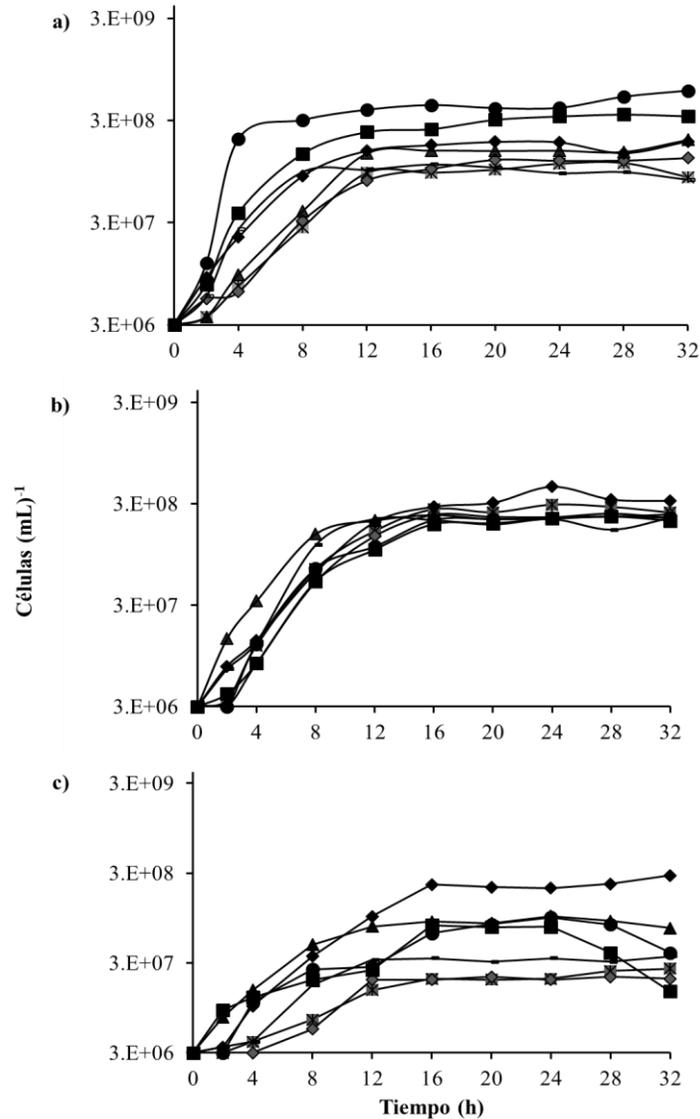


Figura 21. Crecimiento de las levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* (—*—), *D. hansenii* PYCGS115 (—■—), *D. hansenii* ISA1510 (—◇—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terricola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◇—).

Para las cinéticas cuya fuente de carbono suministrada fue la sacarosa, se observa el crecimiento similar al obtenido en las cinéticas realizadas con glucosa, se presenta una fase de adaptación corta pero la fase de crecimiento exponencial es más prolongada respecto a las cinéticas con glucosa. La fase exponencial inicia de manera general alrededor de la hora 2 y se llega a la fase estacionaria en un tiempo cercano a las 12 horas. Figura 21b.

El crecimiento de las levaduras en el medio con celulosa como fuente de carbono es menor en comparación con las otras fuentes de carbono estudiadas, como se aprecia en la Figura 21c. Se observan fases de adaptación y de crecimiento exponencial prolongadas para la mayoría de las cepas, iniciando la fase estacionaria entre las horas 12 y 16. Esto indica una baja capacidad de metabolizar esta fuente de carbono, por lo tanto, se requiere un análisis de los tiempos de duplicación y velocidad específica que se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Tiempo de duplicación (t_D) y velocidad específica de crecimiento (μ) de las levaduras en medio con inductor glucosa, sacarosa y celulosa respectivamente. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar, $n=2$.

Levadura	Glucosa		Sacarosa		Celulosa	
	μ (h^{-1})	t_D (h)	μ (h^{-1})	t_D (h)	μ (h^{-1})	t_D (h)
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	0.30 \pm 0.07	1.64 \pm 0.11	0.12 \pm 0.02	2.51 \pm 0.40	0.08 \pm 0.00	3.76 \pm 0.08
<i>C. utilis</i>	0.30 \pm 0.09	1.68 \pm 0.05	0.20 \pm 0.02	1.52 \pm 0.16	0.10 \pm 0.02	2.92 \pm 0.50
<i>C. parapsilosis</i>	0.23 \pm 0.05	2.07 \pm 0.18	0.15 \pm 0.01	2.04 \pm 0.08	0.12 \pm 0.01	2.55 \pm 0.31
<i>P. kluyveri</i>	0.21 \pm 0.00	2.38 \pm 0.68	0.20 \pm 0.00	1.51 \pm 0.01	0.07 \pm 0.00	4.47 \pm 0.00
<i>I. terricola</i>	0.24 \pm 0.00	2.09 \pm 0.57	0.22 \pm 0.01	1.38 \pm 0.04	0.10 \pm 0.00	3.16 \pm 0.00
<i>P. pastoris</i>	0.26 \pm 0.08	1.98 \pm 0.06	0.13 \pm 0.01	2.31 \pm 0.09	0.06 \pm 0.01	5.16 \pm 1.21
<i>D. hansenii</i> ISA1510	0.16 \pm 0.02	2.10 \pm 0.18	0.19 \pm 0.02	1.61 \pm 0.14	0.11 \pm 0.03	2.93 \pm 0.79

La velocidad específica de crecimiento en los medios con glucosa, se mantienen en valores similares y dentro el intervalo esperado, al cambiar de medio se puede observar la velocidad de crecimiento comienza a disminuir. Por otra parte, el tiempo de duplicación, el cual nos da la información como indicador del metabolismo de las levaduras, siendo usado para comprobar el efecto ya sea, positivo o negativo, de un sustrato sobre los microorganismos, de esta manera podemos observar que para glucosa, *D. hansenii* PYC 2968, tuvo el menor tiempo de duplicación seguido de *C. utilis* y *P. pastoris*, en el caso de sacarosa, *I. terricola* tuvo mejor adaptación al medio, seguida de *P. kluyveri* y *C. utilis*, y por ultimo para los medios con celulosa las tres levaduras mejores adaptadas fueron: *C. parapsilosis*, *C. utilis* e *I. terricola* son las levaduras que metabolizan las tres fuentes de carbono con los mejores tiempos, lo cual nos indica que pueden utilizarse en procesos de degradación con fuentes de carbono más complejos teniendo efecto positivo.

5.2.8 pH de levaduras no-convencionales como productoras de enzima β -glucosidasa

El potencial de hidrogeno (pH) es un indicador de la actividad metabólica llevada a cabo por la célula. Los cambios de pH en los medios con glucosa y sacarosa (Figura 22^a y 22^b, respectivamente) tienen un comportamiento similar en el que el crecimiento celular provoca una disminución del pH, el cual se puede deber a la liberación de protones, de ácidos orgánicos al medio de fermentación, así como, a que la levadura toma los nitrógenos de los aminoácidos orgánicos, cambiando su carácter anfótero a ácido, (González-Hernández, *et al.*, 2015) y una subsecuente estabilización en el pH de los sistemas de homeostasis de la levadura (Serrano, *et al.*, 1986).

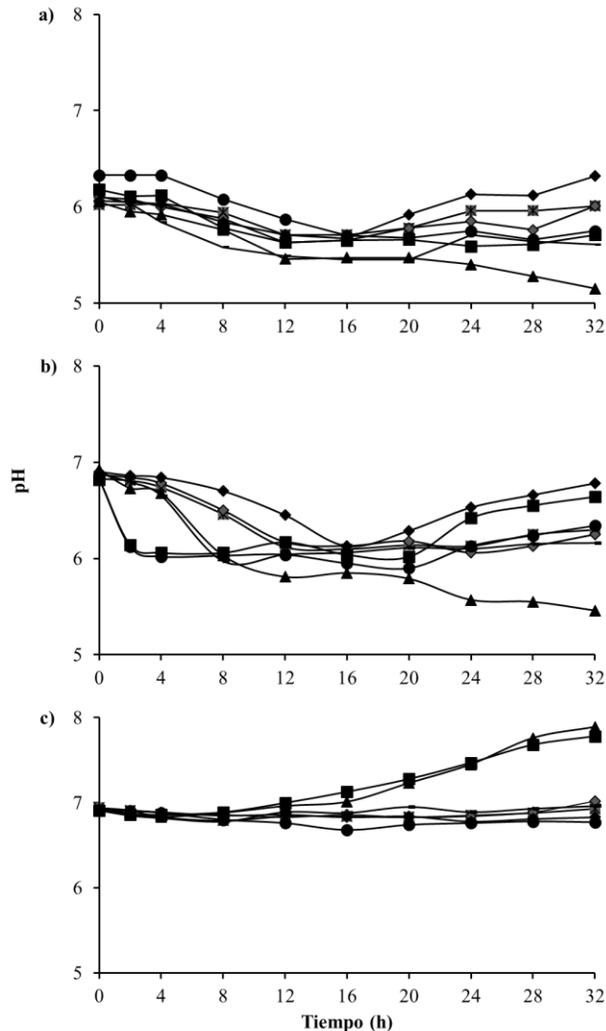


Figura 22. Potencial de hidrogeno monitoreado durante las cinéticas de las levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* (—x—), *D. hansenii* PYC 2968 (—), *D. hansenii* ISA1510 (—◆—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—).

La cepa *C. utilis* mostró una acidificación constante de los medios con glucosa y sacarosa durante todo el desarrollo de la cinética, de manera contraria a lo observado en los medios con glucosa y sacarosa, las fermentaciones llevadas a cabo con celulosa como fuente de carbono mostraron una ligera tendencia a la acidificación para consecuentemente observarse una alcalinización significativa de los medios de fermentación (Figura 22c).

Dicha tendencia se debe a la formación de un complejo intermedio entre el ion hidrógeno y un átomo de oxígeno de la cadena glucosídica, atrapando los protones libres en el medio, provocando la alcalinización del medio. Esta estructura intermedia es el paso previo a la degradación hidrolítica de la molécula de celulosa, en moléculas más simples. La alcalinización se observó principalmente con las cepas *C. utilis* y *P. kluyveri*, donde los valores de pH al finalizar aumentaron 0.9 y 0.8 unidades en comparación con el valor inicial respectivamente. Además, el pH alcalino con valores entre 6 y 7.5, ha sido reportado como el intervalo óptimo para la producción enzimática, siendo una de las dos variables que tienen mayor influencia sobre la actividad, (Granados y Valderrama, 2003).

5.2.9 Azúcares reductores cuantificados en cinéticas de crecimiento de levaduras no-covencionales productoras de β -glucosidasa

El análisis de los azúcares reductores muestra comportamientos significativamente diferentes en cada uno de los sustratos evaluados. Para los medios suministrados con glucosa se observa su disminución en todas las cepas (Figura 23^a). Por el contrario, para los medios de sacarosa y celulosa, no es posible determinar la concentración de azúcares por esta técnica, ya que no se trata de azúcares reductores.

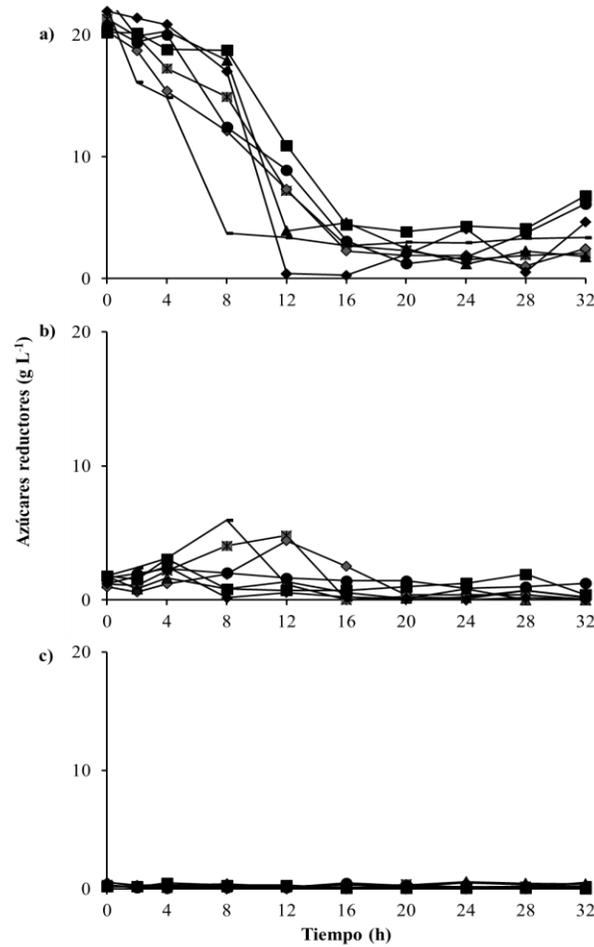


Figura 23. Determinación de azúcares reductores de levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) glucosa, b) sacarosa, c) celulosa. *P. pastoris* (—✕—), *D. hansenii* PYC 2968 (—■—), *D. hansenii* ISA1510 (—●—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—).

Sin embargo, para las fermentaciones con sacarosa como fuente de carbono muestran un aumento paulatino en la concentración y su consecuente disminución hasta el final de la fermentación, lo cual se atribuye a la descomposición de la sacarosa en los azúcares reductores fructosa y glucosa, siendo visible en las cepas *D. hansenii* ISA1510, *P. kluyveri* y *C. utilis*, donde el aumento de azúcares reductores se observa hasta la hora 8 para *D. hansenii* ISA1510 y la hora 12 para *P. kluyveri* y *C. utilis* como se observa en la Figura 23b.

5.2.10 Actividad enzimática de β -glucosidasa

La actividad enzimática se realizó en base a la cuantificación de *p*-nitrofenil, liberado por la reacción de las enzimas sobre el enlace glucosídico de la molécula 1-3- β -D-glucopiranosido.

Como se observa en la Figura 24^a, la actividad enzimática en medio de crecimiento con glucosa, *P. pastoris* mostró mayor actividad enzimática respecto al resto de las levaduras, comenzando en la hora 12 con 0.1044 ± 0.00 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína con un máximo de 0.1682 ± 0.00 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína a las 28 horas, seguida de *C. parapsilosis*, con un máximo en la hora 28, con 0.0768 ± 0.0103 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína. Como se mencionó anteriormente, la máxima actividad enzimática se presentó en la hora 28, a continuación, se indican los microorganismos en orden de descenso respecto a la actividad presentada: *C. utilis* 0.0734 ± 0.00 ; *D. hansenii* *PYC ISA 1510* 0.0548 ± 0.0047 ; *I. terrícola* 0.0544 ± 0.0000 ; *D. hansenii* *PYC 2968* 0.0523 ± 0.0072 ; *P. kluyveri* 0.0512 ± 0.000 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína.

En la figura 24b), se muestran las actividades enzimáticas correspondientes en medio con sacarosa, en donde la mayor actividad enzimática la presentó *C. utilis* y *P. pastoris*, las dos levaduras presentaron un comportamiento similar, teniendo un aumento considerable en la hora 20 con 0.0481 ± 0.0048 y 0.0506 ± 0.0141 registrando sus máximos en 28 horas, con 0.0657 ± 0.0214 y 0.0635 ± 0.0027 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, respectivamente. de estos microorganismos siguieron: *I. terrícola* 0.0558 ± 0.0659 ; *D. hansenii* *PYC 2968* 0.0516 ± 0.0102 ; *P. kluyveri* 0.0468 ± 0.0150 ; *D. hansenii* *PYC ISA 1510* 0.0365 ± 0.0162 ; *C. parapsilosis* 0.0162 ± 0.0036 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína.

Las levaduras no convencionales evaluadas, metabolizaron la celulosa, sin embargo, *C. utilis*, es la única que presentó actividad enzimática destacada, comenzando a partir de la hora 20 de fermentación con 0.0145 ± 0.01 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, presentando del máximo a la hora 28 con 0.1129 ± 0.1349 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, en estos resultados destacan *C. parapsilosis*, comenzando en la hora 20 con 0.0211 ± 0.0038 y con el máximo en la hora 24 con 0.0412 ± 0.0269 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, *I. terrícola*, *P. kluyveri* y *P. pastoris*, presentaron al máximo expresión enzimática en la hora 20, y 28, con 0.0340 ± 0.00 , 0.0189 ± 0.00 , y 0.0077 ± 0.0042 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína, respectivamente, y por ultimo con su máximo en la hora 28 *D. hansenii* *PYC ISA 1510* con 0.0071 ± 0.0029 y *D. hansenii* *PYC 2968* con 0.0038 ± 0.0009 $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ de proteína. Los resultados obtenidos favorecen a las levaduras del género *Candida* y *Pichia*, como productoras de β -glucosidasa, las cuales han sido reportadas con actividad intracelular y extracelular, (Rosi, *et al.*, 1994).

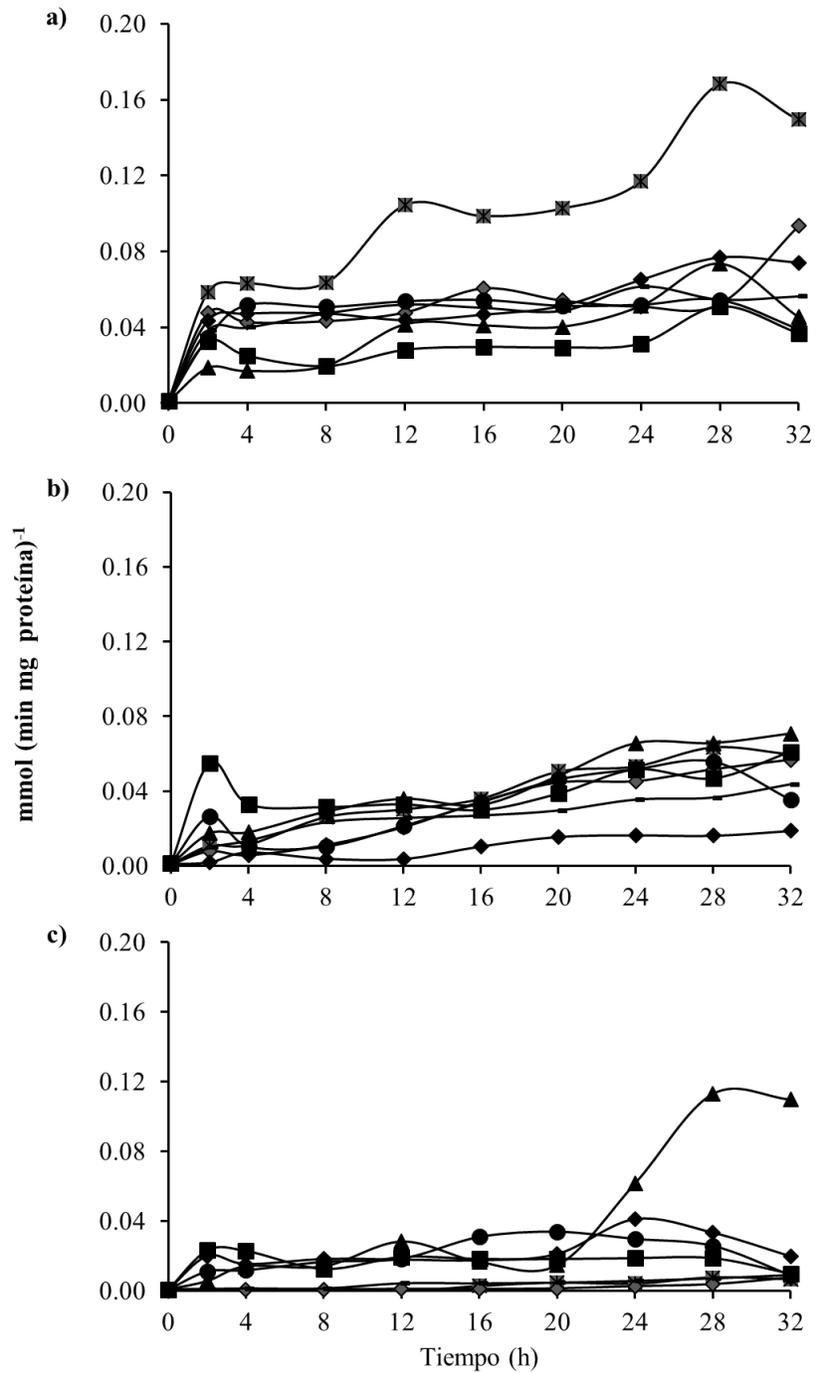


Figura 24. Determinación de actividad enzimática de levaduras no-convenciones utilizando como fuente de carbono: a) celulosa, b) sacarosa, c) glucosa. *P. pastoris* (—x—), *D. hanseni* PYC 29685 (—), *D. hanseni* ISA1510 (—◇—), *C. utilis* (—▲—), *P. kluyveri* (—■—), *I. terrícola* (—●—), *C. parapsilosis* (—◆—).

C. utilis es el microorganismo que mejor se adaptó a las tres fuentes de carbono, y fue corroborada por los tiempos de duplicación cuyo valor fue destacado en los tres casos, en la

actividad enzimática destaca por su capacidad de metabolizar moléculas complejas como la celulosa, y la sacarosa, presentando también actividad en sustratos sencillos como la glucosa. De la misma forma *C. parapsilosis*, presentó un efecto positivo en su metabolismo con la celulosa, y presentando actividad enzimática similar en el medio con glucosa, además esta levadura destacó en los resultados de rojo Congo, al igual que *I. terrícola*, la cual presentó actividad enzimática viable con sacarosa y celulosa. Podemos observar que *P. pastoris* es un microorganismo cuya actividad enzimática se ve beneficiada en sustratos más sencillos.

Algunas de las investigaciones realizadas para la expresión de β -glucosidasas en levaduras no-convencionales, se muestran en la Tabla 18, únicamente dos investigaciones que corresponden a Yanai y Sato, (1999) y Turan y Zheng, (2005) se presentan sus resultados con unidades afines a esta investigación, en donde se puede apreciar que las actividades enzimáticas están en el intervalo que han obtenido otras investigaciones, en donde *P. pastoris* con fuentes de carbono de glucosa y *C. utilis* con celulosa son similares a lo que se ha reportado, los demás resultados aunque se presentan no pueden ser comparables en magnitud, sin embargo, se puede destacar las especies de levaduras no convencionales ya estudiadas y caracterizadas, otras cepas encontradas en literatura que se han reportado con actividad β -glucosidasa levaduras del género *Kloeckera*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*, y *Kluyveromyces*, (Starauss, *et al.*, 2001; Rodríguez, *et al.*, 2004; Cordero-Otero, *et al.*, 2003; Arevalo-Villena, *et al.*, 2006).

Sin embargo, la actividad enzimática que se determinó es extracelular, los hongos aerobios cuentan con un sistema de celulasas no complejo, lo cual conlleva a la secreción de enzimas hidrolíticas de celulosa en el medio de cultivo. Los sistemas aerobios en donde se requiere de agitación y aireación continuas implican una pérdida de las enzimas secretadas y de los intermediarios de degradación afectando la eficiencia del proceso.

Además, se aprecia que la actividad enzimática está estrechamente correlacionada con el inicio de la fase de crecimiento, presentando el máximo durante la fase estacionaria. La glucosa y la sacarosa fueron mejores inductores que la celulosa de la actividad de la enzima β -glucosidasa, la cual forma parte del sistema de celulasas que está conformado por endoglucanasas, exoglucanasas y β -glucosidasas, las cuales hidrolizan sinérgicamente la celulosa cristalina.

Tabla 18. Actividad de β -glucosidasa reportada en levaduras no-convencionales reportadas por diversas investigaciones.

Microorganismo	Actividad de β -glucosidasa			Referencias
<i>C. molischiana</i>	0.0048 ^a			Gunata, Bayonove, Arnaud y Galzy, 1990
<i>C. wickerhamii</i>	0.0002 ^a			
<i>D. hansenii</i>	0.121 ^b			Yanai y Sato, 1999
<i>Aurebasidium pallulans</i>	2279 ^c			
<i>C. guillermondii</i>	230 ^c			McMahom, Zoecklein, Fugelsang y Jasinski, 1999
<i>C. parapsilosis</i>	1313 ^c			
<i>H. anomala</i>	587 ^c			
<i>K. apiculata</i>	621 ^c			
<i>P. guillermondi</i>	105 ^c			
<i>C. molischiana</i>	0.0031 ^a			Fernández- González. Di Stefano y Briones, 2003
<i>D. hansenii</i>	0.0000483 ^a			
<i>H. uvarum</i>	0.0000217 ^a			
<i>M. pulcherrima</i>	0.000205 ^a			
<i>K. thermotolerans</i>	0.0000217 ^a			
<i>P. kluyveri</i>	0.0000233 ^a			
<i>P. pastoris</i>	0.11 ^b			
<i>I. terricola</i>	0.024 ^b			Turan yZheng, 2005
				González-Pombo. Farina, Carrau, Batista y Brena., 2011
<i>C. utilis</i>	0.12 ^b			Sim y Hang, 1996
	Glucosa^b	Sacarosa^b	Celulosa^b	
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	0.0523±0.0072	0.0516±0.0102	0.0038±0.0009	Esta investigación
<i>C. utilis</i>	0.0734±0.0000	0.0657±0.0214	0.1129±0.1349	
<i>C. parapsilosis</i>	0.0768±0.0103	0.0162±0.0036	0.0334±0.0230	
<i>P. kluyveri</i>	0.0512±0.0000	0.0468±0.0150	0.0189±0.0000	
<i>I. terricola</i>	0.0544±0.0000	0.0558±0.0659	0.0258±0.0000	
<i>P. pastoris</i>	0.1682±0.0000	0.0635±0.0027	0.0077±0.0042	
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	0.0548±0.0047	0.0365±0.0162	0.0071±0.0029	

La celulosa, tiene una compleja estructura y gran cantidad de enlaces β -1-4, representando un reto para los procesos de hidrólisis, debido a que estará determinada por el área de contacto entre la enzima y la molécula, las dimensiones de los poros de las fibras, así como, por la cristalinidad de la molécula, (Buschle, *et al.*, 1994).

La cristalinidad de una molécula de celulosa está determinada por los enlaces de hidrógeno intermoleculares formando una estructura fibrilar terciaria de alta cristalinidad, zona en la que las endoglucanasas hidrolizan la molécula para formar zonas amorfas, obteniendo cadenas con menor grado de polimerización. La enzima exoglucanasa β -1,4, continúa la acción de la endoglucanasa sobre la misma cadena, liberando como producto el dímero de la glucosa, que es la celobiosa. Dentro de este proceso la β -1,4 glucosidasa, completa el proceso hidrolítico convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos, (Lynd *et al.*, 2005). Siendo *C. utilis* la levadura que lleva a cabo este proceso siendo la única en mostrar actividad enzimática en un medio tan complejo como es la celulosa.

De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos por Zhang *et al.*, en el 2006, la estructura heterogénea de la celulosa es insoluble e induce la disminución en la tasa de hidrólisis en corto tiempo (menos de una hora) provocando la desactivación del sistema de celulasas. Por lo cual se requiere una previa adsorción de la enzima al sustrato mediante dominios que cuenten con aminoácidos aromáticos que son susceptibles al enlace con la enzima mediante uniones por fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno, (Mansfield, *et al.*, 1997).

5.3 Obtención de ácido elálgico a nivel biorreactor

5.3.1 Diseño de experimentos

Se utilizó un diseño de experimentos de mezclas simplex-lattice, con tres variables las cuales corresponden a las tres levaduras no-convencionales seleccionadas. Como variable de respuesta se analizó la cantidad de ácido elálgico determinado por HPLC. Las corridas totales del diseño fueron 15 para cada frutilla, considerando 5 puntos centrales y los vértices, se realizó el análisis estadístico por medio del programa Statgraphics®. Las corridas se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Diseño de mezclas simplex-lattice con las levaduras como variables, se consideraron 5 puntos centrales y los vértices.

Corrida	<i>D. hansenii</i> ISA1510	<i>P. pastoris</i>	<i>C. utilis</i>
1	0.16667	0.16667	0.66667
2	0.0	0.0	1
3	0.5	0.0	0.5
4	0.66667	0.16667	0.16667
5	1	0.0	0.0
6	0.0	1	0.0
7	0.0	0.5	0.5
8	0.5	0.5	0.0
9	0.33333	0.33333	0.33333
10	0.16667	0.66667	0.30
11	1	0.0	0.16667
12	0.5	0.5	0.0
13	0.5	0.0	0.0
14	0.0	1.0	0.5
15	0.0	0.5	0.0

5.3.2 Crecimiento celular de consorcios puros y mixtos a nivel biorreactor

Las cinéticas de crecimiento llevadas a cabo mediante un consorcio de levaduras que incluye: *D. hansenii* PYC ISA 1510 = 0.5×10^6 , *C. utilis* = 0.5×10^6 y *P. pastoris* = 2×10^6 células (Figura 25). Se realizó la evaluación de dos medios de fermentación, uno utilizando como fuentes de elagitaninos la Fresa y el otro utilizando Zarzamora, se observó que no existe diferencia significativa en las fases de crecimiento, destacando la nula visibilidad de la fase lag en la gráfica, debido a que se presenta durante las primeras dos horas de fermentación, que es el mismo tiempo en que se lleva a cabo a nivel matraz, indicando que los microorganismos evaluados se adaptan con facilidad a los medios de fermentación. Posteriormente se presentó la fase exponencial de la

cinética con duración de 6 a 8 horas aproximadamente, para comenzar con la fase estacionaria, la cual comienza a las 8 horas de fermentación, siendo la etapa más prolongada del proceso. Estas cinéticas de crecimiento fueron comparadas con el crecimiento de *D. hansenii* PYC ISA 1510 para Fresa y *C. utilis* para Zarzamora, cuyo comportamiento es similar a los puntos puros.

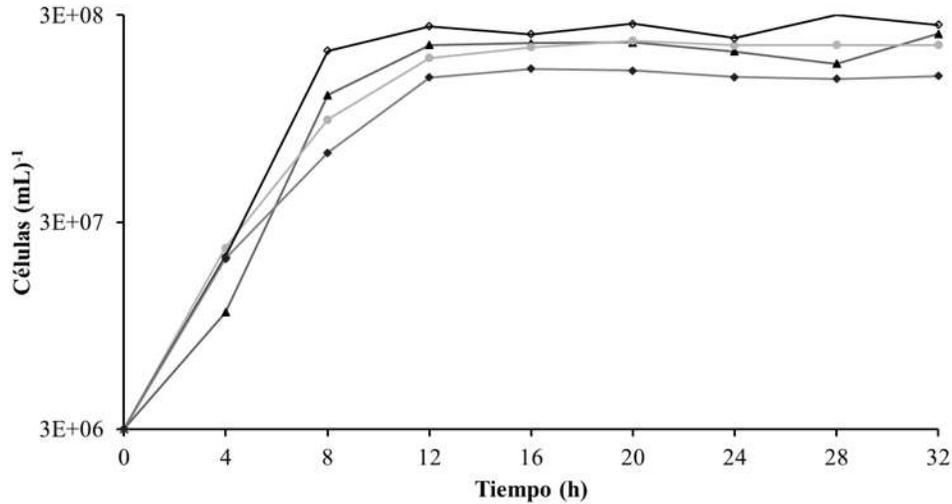


Figura 25. Crecimiento celular de un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zarzamora (◐). Comparado con el crecimiento microbiano de cultivos puros para Fresa *D. hansenii* PYC ISA 1510 (●), y para Zarzamora *C. utilis* (▼).

El tipo de comportamiento que se presenta durante la cinética se considera estándar ya que es característica de este tipo de microorganismos, por lo cual se realizó la evaluación de los parámetros cinéticos como el tiempo de duplicación (t_D) y la velocidad específica de crecimiento (μ), cuyos valores obtenidos en los medios se muestran en la Tabla 20. Los medios que contenían Fresa presentaron mejores valores, destacando *Debaryomyces hansenii* PYC ISA1510= 1.5×10^6 con *Pichia pastoris*= 1.5×10^6 células, cuya corrida presentó valores de $t_D= 1.73$ h y $\mu= 0.17$ h⁻¹, siendo el menor tiempo de duplicación de todo el diseño, continuo la corrida *Debaryomyces hansenii* PYC ISA1510= 0.5×10^6 , *Candida utilis*= 0.5×10^6 , *Pichia pastoris*= 2×10^6 células con $t_D= 1.87$ h y $\mu= 0.16$ h⁻¹, después *Debaryomyces hansenii* PYC ISA1510= 0.5×10^6 , *Candida utilis*= 2×10^6 , *Pichia pastoris*= 0.5×10^6 células con $t_D= 1.92$ h y $\mu= 0.16$ h⁻¹, mientras que Zarzamora los valores de $t_D= 2.27$ h y $\mu= 0.13$ h⁻¹, pertenecieron a la corrida *Debaryomyces hansenii* PYC ISA1510=

0.5×10^6 , *Candida utilis* = 2×10^6 , *Pichia pastoris* = 0.5×10^6 células, seguido de *Debaryomyces hansenii* PYC ISA1510 = 2×10^6 , *Candida utilis* = 0.5×10^6 , *Pichia pastoris* = 0.5×10^6 células con $t_D = 2.39$ h y $\mu = 0.13$ h⁻¹, y después destaco la corrida con *P. pastoris* en cultivo puro con $t_D = 2.41$ h y $\mu = 0.13$ h⁻¹.

Tabla 20. Tiempo de duplicación (t_D) y velocidad específica de crecimiento (μ) de las levaduras en consorcio puro y mixto. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar, $n=3$.

Corrida	Fresa		Zarzamora	
	μ (h ⁻¹)	t_D (h)	μ (h ⁻¹)	t_D (h)
<i>D. hansenii</i> ISA 1510(0.5×10^6), <i>C. utilis</i> (0.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (2×10^6)	0.16 \pm 0.06	1.87 \pm 0.57	0.11 \pm 0.12	2.62 \pm 0.14
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (1.5×10^6)	0.17 \pm 0.11	1.73 \pm 0.12	0.11 \pm 0.08	2.65 \pm 0.25
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (0.5×10^6), <i>C. utilis</i> (2×10^6), <i>P. pastoris</i> (0.5×10^6)	0.16 \pm 0.05	1.92 \pm 0.12	0.13 \pm 0.01	2.27 \pm 0.35
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1×10^6), <i>C. utilis</i> (1×10^6), <i>P. pastoris</i> (1×10^6)	0.14 \pm 0.07	2.16 \pm 0.25	0.03 \pm 0.07	8.96 \pm 0.52
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (2×10^6), <i>C. utilis</i> (0.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (0.5×10^6)	0.12 \pm 0.09	2.53 \pm 0.14	0.13 \pm 0.06	2.39 \pm 0.13
<i>C. utilis</i> (1.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (1.5×10^6)	0.09 \pm 0.15	3.47 \pm 0.44	0.11 \pm 0.07	2.70 \pm 0.40
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1.5×10^6), <i>C. utilis</i> (1.5×10^6)	0.11 \pm 0.02	2.80 \pm 0.08	0.11 \pm 0.05	2.69 \pm 0.07
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	0.14 \pm 0.01	2.17 \pm 0.15	0.12 \pm 0.03	2.52 \pm 0.10
<i>P. pastoris</i>	0.13 \pm 0.21	2.26 \pm 0.14	0.13 \pm 0.02	2.41 \pm 0.09
<i>C. utilis</i>	0.11 \pm 0.06	2.86 \pm 0.36	0.11 \pm 0.07	2.75 \pm 0.18

Como se muestra los microorganismos que se inocularon en los medios con Fresa tuvieron mayor adaptación respecto a los que crecieron en medios con Zarzamora, ya que los valores de velocidad de crecimiento fueron mayores y tiempo de suplicación fueron menores. Los valores entre las corridas fueron muy similares a excepción de la corrida de *Candida utilis* = 1.5×10^6 , *Pichia pastoris* = 1.5×10^6 células, en donde los valores de velocidad de duplicación fueron muy pequeños y por lo tanto el tiempo de duplicación muy grandes, a comparación de las otras corridas.

Para los medios con Zarzamora, como se mencionó los valores no fueron favorables haciendo una comparación con Fresa, indicando que es más difícil para el consorcio metabolizar el medio con Zarzamora, además de que las corridas en consorcio mixto no fueron favorables a comparación con los cultivos puros.

La comparación de estos resultados con otras investigaciones es un poco complicado debido a la escasa información de consorcios de levaduras utilizados en fermentaciones, por lo cual se realiza la comparación con las velocidades medias de crecimiento de levaduras no-convencionales como son *Candida shehatae*, *Candida guilliermondii*, y *Saccharomyces kluyveri*, con velocidades medias de crecimiento de $0.32 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, $0.30 \pm 0.07 \text{ h}^{-1}$ y $0.19 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (González-Hernández *et al.*, 2015).

Se puede observar que las velocidades de crecimiento son menores en los resultados presentados en el biorreactor, incluyendo los resultados de los puntos puros, para *Debaryomyces hansenii* PYC ISA1510= 3×10^6 , $t_D = 2.17 \text{ h}$ y $\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$ para Fresa y $t_D = 2.52 \text{ h}$ y $\mu = 0.12 \text{ h}^{-1}$ para Zarzamora, *Candida utilis*= 3×10^6 , $t_D = 2.86 \text{ h}$ y $\mu = 0.11 \text{ h}^{-1}$ para Fresa y $t_D = 2.75 \text{ h}$ y $\mu = 0.11 \text{ h}^{-1}$ para Zarzamora, *Pichia pastoris*= 3×10^6 , $t_D = 2.26 \text{ h}$ y $\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$ para Fresa y $t_D = 2.41 \text{ h}$ y $\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$ para Zarzamora. La diferencia con los cultivos puros reportados con los valores obtenidos en esta investigación, se le atribuye a que la levadura tiene mayor acceso a nutrientes para aumentar su velocidad de crecimiento y duplicarse en un menor tiempo en otros procesos, además de que la presencia de elagitaninos cambia, como es de esperarse el comportamiento de las levaduras. Aunado a esto se puede destacar que el consorcio microbiano mixto tiene valores de los parámetros evaluados similares a los cultivos puros que se utilizaron en esta investigación.

5.3.4 pH a nivel biorreactor

El potencial de hidrogeno (pH) es un indicador de la actividad metabólica llevada a cabo por la célula. Los cambios de pH en los medios con *D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células, para Zarzamora y Fresa, son comparados con el cambio de pH de cultivos puros para *C. utilis* para Fresa y para Zarzamora (Figura 26), en los cultivos puros se presentó una acidificación propia de la levadura, la cual es característica del crecimiento celular el cual provoca una disminución del pH, debido a la liberación de protones, de ácidos orgánicos al medio de fermentación, así como, a que la levadura toma los nitrógenos de los aminoácidos orgánicos, cambiando su carácter anfótero a ácido (González-Hernández *et al.*, 2015) y una subsecuente estabilización en el pH de los sistemas de homeostasis de la levadura (Serrano *et al.*, 1986). Mientras que los consorcios mixtos disminuyeron de forma paulatina y gradual, reduciendo media unidad para el caso de la Fresa y una tercera parte para Zarzamora.

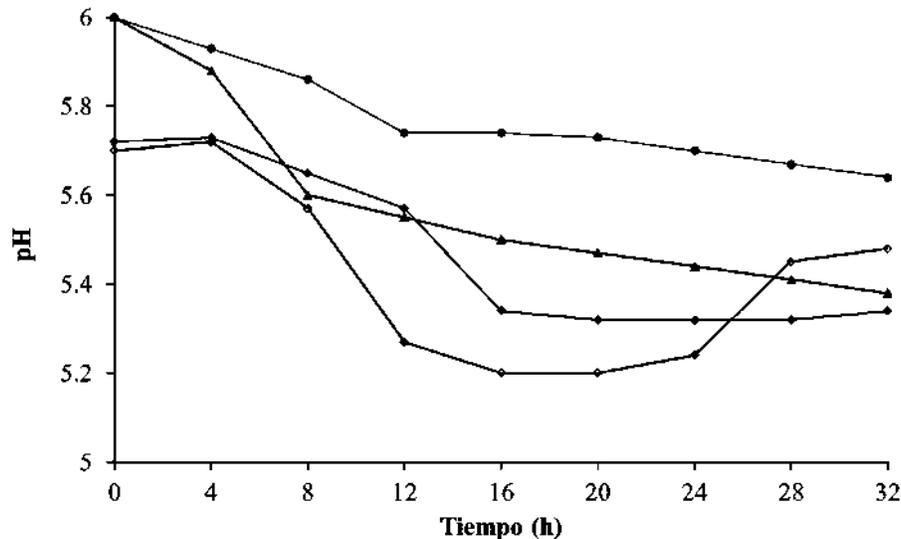


Figura 26. Cambios de pH durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510, *C. utilis* y *P. pastoris*), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zarzamora (●). Comparado con el crecimiento microbiano de cultivos puros para Fresa *C. utilis* (◊), y para Zarzamora *C. utilis* (◆).

Los medios comenzaron con un pH de 6, llevando el proceso de acidificación hasta 5.3 para los medios con Zarzamora y 5.64 para los medios con Fresa. Además del proceso característico de acidificación del pH, se debe aclarar que se ha reportado que su máxima actividad se presenta en valores de pH ácidos, 4.3 -6.5 para tanasa y de 5- 6.3 para β -glucosidasa, destacando que los datos obtenidos nos indican que le pH es óptimo para la expresión de ambas enzimas.

5.3.5 Azúcares reductores y determinación de la cantidad de elagitaninos

Para el análisis del consumo de azúcares reductores se toma como ejemplo el la corrida experimental de *D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células, para Zarzamora y Fresa, son comparados con el consumo de azúcares de cultivos puros para *C. utilis* para Fresa y para Zarzamora ambos medios comenzaron con 20 g/L de azúcares aproximadamente, Figura 27, el consumo de estos se llevó a cabo con mayor rapidez en los medios cuya fuente de elagitaninos fue la Fresa en cultivo mixto, llegando al consumo máximo de azúcares en tan solo 12 horas de fermentación. Por otra parte, aunque el proceso fue similar para los medios con Zarzamora en cultivo mixto, su máximo consumo de azúcares se presentó a las 32 horas, manteniéndose la cantidad de azúcares en mínima cantidad dese la hora 12, siendo constante

durante 20 horas, hasta que se llegó a 0. En los cultivos puros les tomo más tiempo consumir la fuente de carbono disponible, lo cual se puede deber a la poca competencia por el sustrato.

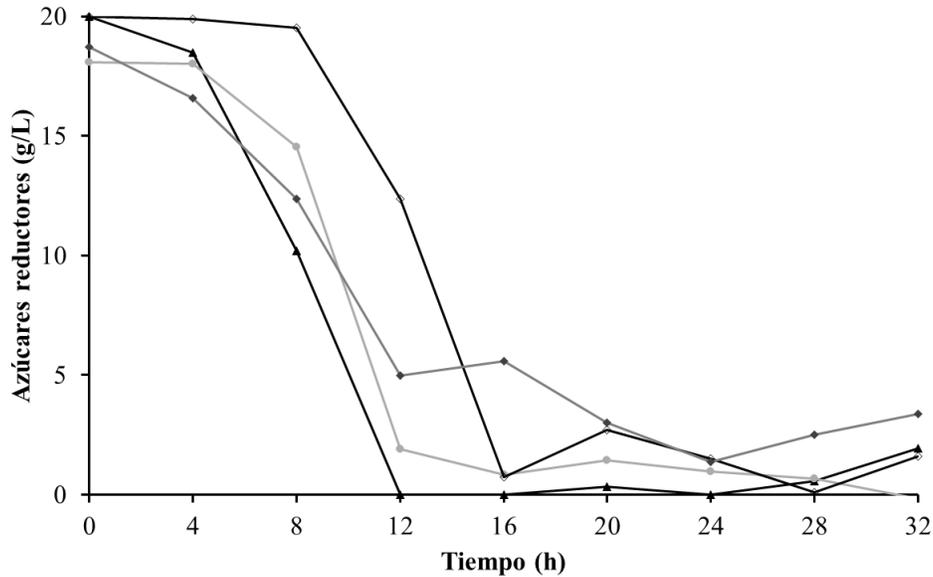


Figura 27. Consumo de azúcares reductores determinados por la técnica de DNS durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zarzamora (●). Comparado con el consumo de azúcares reductores de cultivos puros para Fresa *C. utilis* (◊), y para Zarzamora *C. utilis* (◆).

Por otra parte se llevó a cabo la determinación de elagitaninos durante toda la cinética, como se muestra en la Figura 28, se comparó el cultivo mixto de *D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células, para Zarzamora y Fresa, con el cultivo puro de *P. pastoris* para Fresa y para Zarzamora de *C. utilis* de aquí podemos destacar que la cantidad de elagitaninos es mayor en Fresa que en Zarzamora, en el cultivo mixto teniendo estabilidad en la respuesta, para Fresa se observó una disminución del compuesto en la hora 12 pasando de 7.50 a 5.65 mg/mL y par Zarzamora se observó de 7.8 a 2.15 mg/mL en la hora 4, por otra parte, para el caso de los cultivos puros, se observó que *P. pastoris* tuvo una degradación de elagitaninos de 6 a 0.95 mg/mL en la hora 8 de fermentación. Para *C. utilis* para Zarzamora disminuyo en la hora 8 de 6 a 3.16 mg/mL.

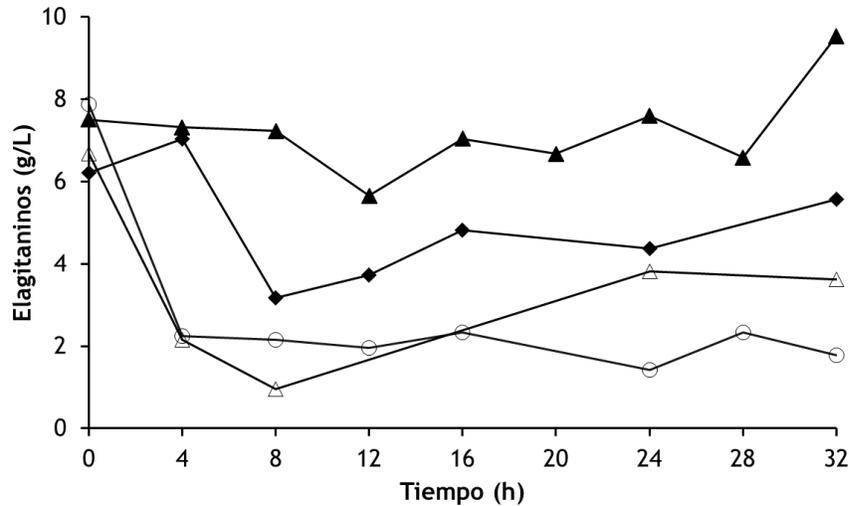


Figura 28. Consumo de elagitaninos durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zarzamora (○). Comparado con el consumo de elagitaninos de cultivos puros para Fresa *P. pastoris* (△), y para Zarzamora *C. utilis* (◆).

Después de la hora en que apareció la disminución significativa del compuesto, la respuesta se mantuvo constante a lo largo del proceso de fermentación, dando indicio de que la estructura el compuesto es muy compleja y su hidrólisis se lleva solo a cabo en una parte de la molécula, dando como resultado una nula diferencia en el proceso de degradación.

5.3.6 Actividades enzimáticas: tanasa y β -glucosidasa

La enzima tanasa cataliza la hidrólisis del ácido tánico dando como producto nueve moléculas de ácido gálico y una glucosa por cada molécula de sustrato, basados en esto se utilizó un método colorimétrico que se detecta por medio de espectrofotométrico con rodamina, la cual reacciona con el ácido gálico presente en el medio formando un compuesto de color rosado, siendo estable después de su formación por al menos 40 minutos, independientemente de la concentración de ácido gálico (Bala *et al.*, 2006). La enzima tanasa tuvo una actividad inconsistente durante todo el proceso de fermentación, llegando a presentar valores nulos en algunos puntos de la cinética (*Figura no mostrada*), lo cual tiene dos posibles explicaciones la primera es que sea debido a que esta enzima es inducible (Doi *et al.*, 1973), requiriendo de la presencia de ácido tánico en el medio, para que se pudiera expresar, lo cual se observó en los experimentos realizado por Márquez-López

(en revisión, 2019), demostrando que al aumentar la concentración de inductor la expresión de la enzima también ascendía.

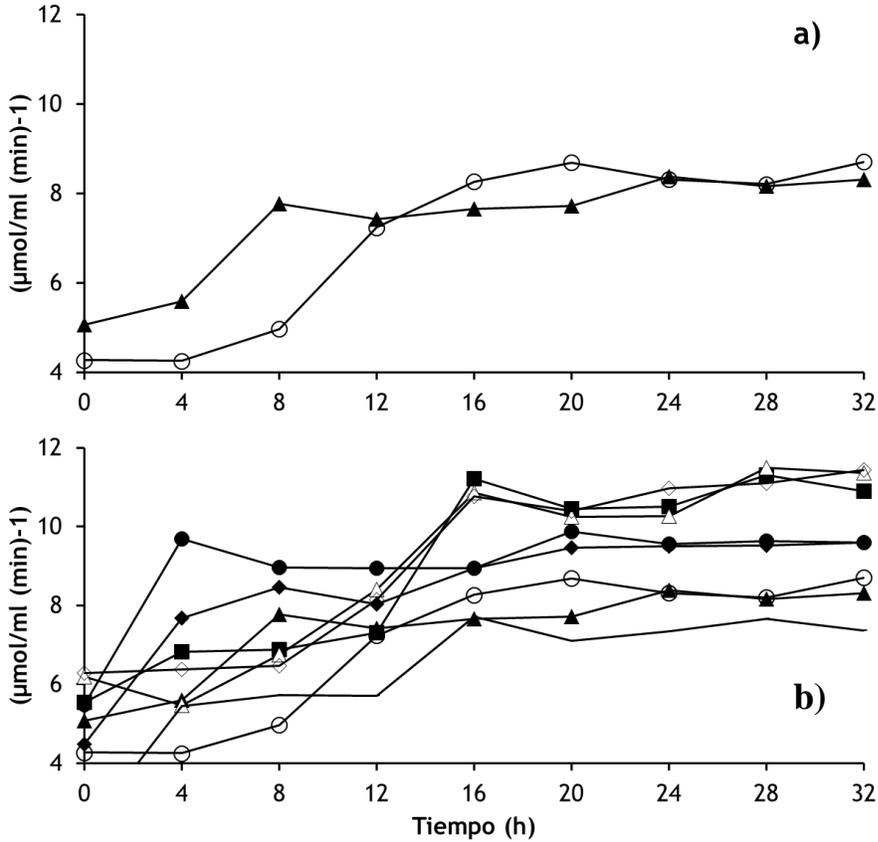


Figura 29. a) Determinación de la actividad β -glucosidasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zarzamora (⊖). b) Determinación de la actividad β -glucosidasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células), utilizando como fuentes de elagitaninos: Fresa (▲) y Zarzamora (⊖). Comparado con la actividad enzimática de cultivos puros para Fresa: *P. pastoris* (▲), *D. hansenii* PYC ISA 1510 (⊖), *C. utilis* (■) y para Zarzamora: *P. pastoris* (◆), *D. hansenii* PYC ISA 1510 (●), *C. utilis* (—).

La segunda explicación se basa en que *P. pastoris* que es la levadura seleccionada como productora de esta enzima no esté creciendo de manera adecuada, debido a que las pruebas de competencia realizadas por Chávez-Madrigril (en preparación, 2019) se pudo determinar que *P. pastoris* no puede ser utilizada en consorcios microbianos, dando indicio de que durante esta

experimentación *P. pastoris* se inhibió y no se produjo enzima en cantidad suficiente para detectarla por medio de la técnica. Para corroborar la primera explicación se tendría que adicionar ácido tánico al medio para determinar si realmente necesita el inductor, sin embargo, esto implicaría problema de competencia por sustrato, y a pesar de que fuera inducida, no se garantizaría que los elagitaninos fueran hidrolizados por esta enzima. Y la segunda explicación lo podríamos corroborar con una prueba de competencia.

Por otra parte, la actividad enzimática de β -glucosidasa se realizó en base a la cuantificación de *p*-nitrofenil, liberado por la reacción de las enzimas sobre el enlace glucosídico de la molécula 1-3- β -D-glucopiranosido, dando resultados favorables como se observa en la Figura 29. En donde se obtuvieron resultados de 4 a 8 $\mu\text{mol/mL}\cdot\text{min}$, destacando los medios con Fresa en cultivo mixto, cuya actividad enzimática comenzó a la hora 8, manteniéndose estable hasta la hora 32, mientras que para Zarzamora en cultivo mixto comenzó a la hora 16 (Figura 2^a). En los cultivos mixtos se presentan valores similares entre los medios con ambas frutillas. Al realizar la comparación con los cultivos puros tanto para Fresa y para Zarzamora (Figura 2b), se aprecia que los cultivos puros de Fresa tienen mayor actividad enzimática β -glucosidasa, respecto a los cultivos puros de Zarzamora. Debido a los resultados obtenidos, se determinó que la enzima encargada de la degradación de los elagitaninos fue la β -glucosidasa.

5.3.7 Evaluación de la producción de ácido elágico por HPLC

Se obtuvo la producción de ácido elágico, indicando que las levaduras no-convencionales produjeron las enzimas encargadas de la degradación de los elagitaninos, lo cual fue corroborado con la medición de la actividad de ambas enzimas, por métodos espectrofotométricos. El monitoreo de la aparición del metabolito de interés se muestra en la Figura 30, presentando corridas representativas del diseño experimental, corrida 1 (*D. hansenii* PYC ISA 1510 = 0.5×10^6 , *C. utilis* = 0.5×10^6 y *P. pastoris* = 2×10^6 células) para Fresa; corrida 2 (1.5×10^6 de *P. pastoris*, 1.5×10^6 de *D. hansenii* PYC ISA 1510) para Zarzamora; corrida 11 (1.5×10^6 de *D. hansenii* PYC ISA 1510 y 1.5×10^6 *C. utilis*) para Fresa y Zarzamora, respectivamente. Comparado con la producción de ácido elágico de cultivos puros para Fresa: *P. pastoris*, *D. hansenii* PYC ISA 1510, *C. utilis*. Se eligió hacer la comparación únicamente con Fresa ya que fueron los cultivos con mayor estabilidad en la respuesta.

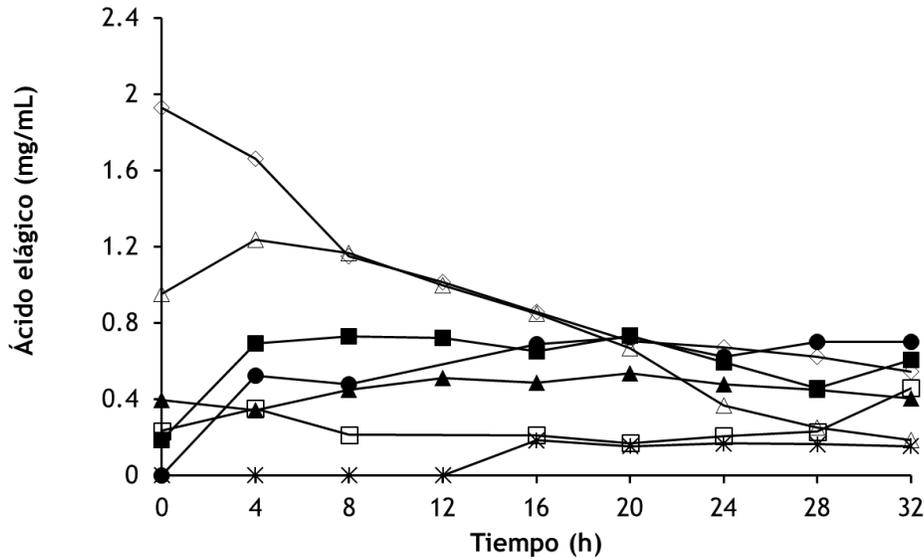


Figura 30. Producción de ácido elágico, metabolito secundario del proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales (*D. hansenii* PYC ISA 1510, *C. utilis* y *P. pastoris*), utilizando como fuentes de elagitaninos Fresa y Zarzamora. Condiciones de cultivo: corrida 1 (*D. hansenii* PYC ISA 1510= 0.5×10^6 , *C. utilis*= 0.5×10^6 y *P. pastoris*= 2×10^6 células) Fresa (▲); corrida 2 (1.5×10^6 de *P. pastoris*, 1.5×10^6 de *D. hansenii* PYC ISA 1510) Zarzamora (*); corrida 11 (1.5×10^6 de *D. hansenii* PYC ISA 1510 y 1.5×10^6 *C. utilis*) Fresa (●) y Zarzamora (◻). Comparado con la producción de ácido elágico de cultivos puros para Fresa: *P. pastoris* (△), *D. hansenii* PYC ISA 1510 (◇), *C. utilis* (■).

Durante la corrida 2 de cultivo mixto de Zarzamora, se observó que a partir de la hora 16, se encontró la producción de ácido elágico, presentando un máximo de 0.16 mg/mL de ácido siendo constante hasta la hora 32. Esta corrida en conjunto con la corrida 11 de cultivos mixtos de Zarzamora, fueron las que presentaron los valores más bajos de todo el diseño experimental, sin embargo, fueron los mejores resultados en Zarzamora. La esta última presentó valores de 0.20 mg/mL de ácido elágico desde la hora 0 de la fermentación. Por otra parte, para Fresa, en la corrida 1, los valores oscilaron de 0.39 a 0.53 mg/mL de ácido elágico, y para la corrida 11 el ácido elágico apareció a partir de la hora 4, llegando a aumentar hasta 0.73 mg/mL. Al realizar una comparación de las mismas condiciones de la corrida del diseño experimental se puede apreciar que se obtiene menos de la tercera parte de ácido elágico con los medios de Zarzamora, respecto a los medios de Fresa. Al observar los puntos puros, *D. hansenii* PYC ISA 1510 y *P. pastoris*, presentan una degradación del compuesto, sin embargo, *C. utilis* tiene un comportamiento estable, llegando a producir hasta 0.73 mg/mL de ácido elágico, siendo similar a la corrida 11 de cultivo mixto de

Fresa, indicando que el cultivo mixto no tiene una influencia significativa sobre la respuesta. El análisis comparativo de los resultados con otras investigaciones se puede realizar únicamente con los procesos en los que se han utilizado hongos filamentosos principalmente, debido a que la información respecto al empleo de las levaduras en este tipo de procesos es muy escasa. En el 2003, Vattem y Shetty analizaron la degradación de elagitaninos presentes en arándanos, utilizando la enzima β -glucosidasa proveniente de la seta *Lentinus edodes*, obteniendo un máximo de 100 $\mu\text{g/g}$ de arándano seco. Huang *et al.*, 2008 utilizó un consorcio de dos hongos filamentosos, *A. oryzae* y *Endomyces fibuliger*, obteniendo 14.87 % de ácido elágico. En el año 2009, Aguilera-Carbó, utilizó *A. niger GHI* como microorganismo productor de tanasa, β -glucosidasa y elagitanasa obteniendo 3 mg/ g de cascara de granada en polvo tras 24 horas de fermentación. Sepúlveda *et al.*, 2017, pudieron producir mediante un hongo filamentosos como es *A. fumigatus* utilizando como fuente de elagitaninos residuos de naranja obteniendo 18.68 mg/g de ácido elágico. De acuerdo con el análisis de experimentos se determinó que el consorcio de tres levaduras no favorece al proceso, ya que su mayor producción de ácido elágico se vería favorecida con la utilización de dos microorganismos. Además, se pudo determinar mediante el análisis de las actividades enzimáticas y en conjunto con el análisis estadístico que la enzima producida por *P. pastoris* se inhibió durante el proceso de fermentación, indicando que las dos levaduras restantes fueron las encargadas de la hidrólisis de los elagitaninos presentes.

5.3.8 Análisis estadístico

Para comenzar con el análisis estadístico, es importante destacar que dentro del diseño de mezclas existen tres diferentes modelos a los que los datos se pueden ajustar, con la finalidad de obtener los parámetros estadísticos importantes. El modelo lineal consiste en términos de primer orden para cada uno de los componentes. El modelo cuadrático agrega productos cruzados entre pares de componentes. El modelo cúbico especial agrega términos que involucran productos de tres componentes. Cada modelo se muestra con un valor-P el cual prueba si ese modelo es estadísticamente significativo cuando se le compara con el cuadrado medio del término de siguiente modelo, es decir, para el diseño de mezclas de Fresa, se ajustó a un modelo cuadrático obteniendo los siguientes resultados, el cuadrado medio del modelo lineal corresponde a 0.006415 y un valor-P de 0.9192, el modelo cuadrático tiene un valor de 0.251154 correspondiente al cuadrado medio y un valor-P de 0.0008, siguiendo con el análisis podemos encontrar que el modelo cúbico tienen

un cuadrado medio de 0.0035365 y un valor-P de 0.6756, siendo el valor-P correspondiente al modelo cuadrático menor que el valor del cuadrado medio del modelo cúbico, siguiendo este criterio, el modelo cuadrático es estadísticamente significativo y es adecuado para los datos. Normalmente, se seleccionaría un modelo más complicado con un valor-P menor que 0.05, asumiendo que se trabaja al nivel de confianza del 95.0%. Para el caso de Zarzamora, se ajustó a un modelo cuadrático obteniendo los siguientes resultados, el cuadrado medio del modelo lineal corresponde a 0.002604 y un valor-P de 0.2580, el modelo cuadrático tiene un valor de 0.005551 correspondiente al cuadrado medio y un valor-P de 0.0014, siguiendo con el análisis podemos encontrar que el modelo cúbico tienen un cuadrado medio de 0.001537 y un valor-P de 0.0523.

El análisis de varianza (ANOVA) realizado en los resultados de Fresa que se seleccionó el método cuadrático, muestra que el valor-P para este modelo es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Ácido elágico (Fresa) y los componentes, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, se obtuvo el estadístico R^2 , el cual indica que el modelo, así ajustado, explica 83.3053% de la variabilidad en Ácido elágico (Fresa). Mientras que para Zarzamora el estadístico R^2 indica que el modelo ajustado explica el 84.8265% de la variabilidad en Ácido elágico (Zarzamora).

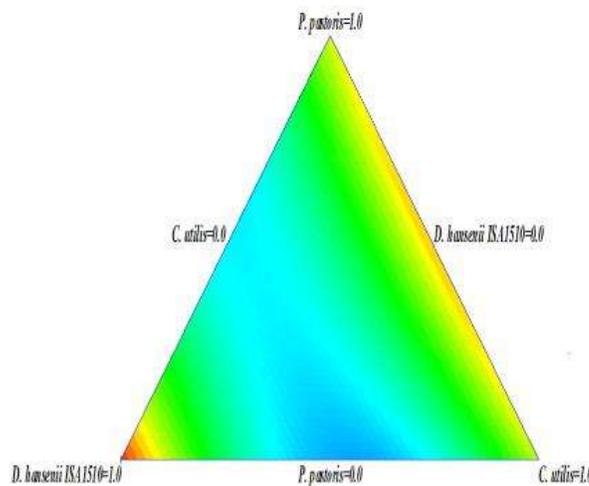


Figura 31. Contornos de la superficie de respuesta estimada con medios de fermentación con elagitaninos provenientes de Fresa, se obtuvieron mediante el análisis estadístico de un diseño de mezclas simplex-lattice mediante

el programa Statgraphics®. Ácido elágico (mg/mL): 0 (■); 0.08 (■); 0.16 (■); 0.24 (■); 0.32 (■); 0.4 (■); 0.48 (■); 0.56 (■); 0.64 (■); 0.72 (■); 0.8 (■).

Como se puede observar en la Figura 31 que se refiere a la superficie de respuesta en Fresa, la mayor cantidad de ácido elágico se produce en los vértices donde se encuentran las levaduras puras, destacando que *C. utilis* tiene mayor producción respecto al resto de las levaduras. También se puede observar las regiones naranjas, amarillas y verdes que indican que la mezcla de dos levaduras puede favorecer la producción de ácido elágico. Además, se puede observar detalladamente, que el consorcio microbiano se ve favorecido por la mezcla de *P. pastoris* y *C. utilis*, o usando *D. hansenii* ISA1510 en estado puro, y al mismo tiempo esta levadura no favorece el proceso en conjunto con *C. utilis*. Además, se puede apreciar que en la región de interacción de las tres levaduras la cantidad de ácido elágico oscila entre los 0.08 y 0.16 mg/mL, siendo cantidades bajas para el objetivo del proceso.

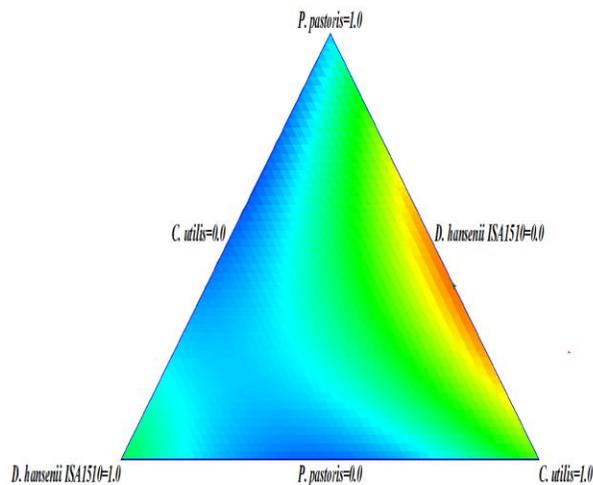


Figura 32. Contornos de la superficie de respuesta estimada con medios de fermentación con elagitaninos provenientes de Zarzamora, se obtuvieron mediante el análisis estadístico de un diseño de mezclas simplex-lattice mediante el programa Statgraphics®. Ácido elágico (mg/mL): 0.11 (■); 0.125 (■); 0.14 (■); 0.15 (■); 0.17 (■); 0.185 (■); 0.2 (■); 0.215 (■); 0.23 (■); 0.245 (■); 0.26 (■).

En la figura 32 muestra que la cantidad de ácido elágico obtenida con Zarzamora es menor respecto a Fresa, en donde la mezcla de las tres levaduras no favorecen en proceso, ya que los

valores van de 0.14 a 0.15 mg/mL, de la misma forma podemos concluir, que la levaduras *P. pastoris* no favorece al proceso ya que al evaluarse en estado puro, la cantidad de ácido elálgico que se produce va de los 0.11 a los 12 mg/mL, por el contrario, el uso de *C. utilis* en mayor cantidad respecto a *P. pastoris* en una mezcla binaria, es lo que más favorece el proceso destacando que *C. utilis* puede ser utilizada de forma pura.

5.4 Evaluación de la interacción entre levaduras por pruebas de competencia

Con base a los resultados obtenidos en donde se observó que era mejor utilizar una combinación binaria se decidió realizar las pruebas de competencia para poder tener certeza en las levaduras que se van a utilizar, así como si es mejor utilizar una combinación binaria o terciaria. Por lo cual los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Resumen de las interacciones entre las cepas de levaduras no-convencionales. Los datos se presentan como el promedio (mm) \pm desviación estándar, $n=2$. El color rojo indica que la interacción fue negativa y el azul una interacción positiva.

Levadura	7	8	19	23	58	59	67
<i>P. pastoris</i>							
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	0.825 \pm 0.064						
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	1.025 \pm 0.049	1.18 \pm 0.382		0.57 \pm 0.014			0.78 \pm 0.071
<i>C. utilis</i>	1.145 \pm 0.021	1.04 \pm 0.057	1.17 \pm 0.042		0.62 \pm 0.028		1.055 \pm 0.035
<i>P. kluyveri</i>	1.19 \pm 0.339	1.1 \pm 0.071	0.79 \pm 0.00	0.9 \pm 0.085		0.555 \pm 0.049	0.815 \pm 0.007
<i>I. terricola</i>	1.71 \pm 0.17	1.095 \pm 0.191	0.72 \pm 0.014	0.845 \pm 0.163	0.905 \pm 0.092		0.765 \pm 0.007
<i>C. parapsilosis</i>	1.07 \pm 0.071	1.15 \pm 0.071	0.815 \pm 0.049	0.76 \pm 0.028			

Se puede observar que *P. pastoris* no es apta para ser utilizada en consorcios microbianos, sin embargo, aún era necesario calcular el efecto individual de cada cepa respecto a las otras seis,

cuando hubo crecimiento sobre la cepa se denoto como un efecto positivo +. Para poder determinar las combinaciones viables de levaduras, ambas deberán tener un efecto positivo +.

Tabla 22. Tabla de efectos individuales sobre una levadura en particular crecimiento sobre la cepa se denoto como un efecto positivo +. Para poder determinar las combinaciones viables de levaduras, ambas deberán tener un efecto positivo +.

Levadura	Sobre	Efecto	Levadura	Sobre	Efecto
<i>D. hansenii</i> PYC 2968		+	<i>D. hansenii</i> PYC 2968		-
<i>D. hansenii</i> ISA 1510		+	<i>D. hansenii</i> ISA 1510		-
<i>C. utilis</i>	<i>P. pastoris</i>	+	<i>P. pastoris</i>	<i>C. utilis</i>	-
<i>P. kluyveri</i>		+		<i>P. kluyveri</i>	-
<i>I. terricola</i>		+		<i>I. terricola</i>	-
<i>C. parapsilosis</i>		+		<i>C. parapsilosis</i>	-
					<i>P. pastoris</i> menos apta para consorcios.
					Todas las cepas inhibieron a <i>P. pastoris</i> .

Levadura	Sobre	Efecto	Levadura	Sobre	Efecto
<i>P. pastoris</i>		+	<i>P. pastoris</i>		-
<i>D. hansenii</i> ISA 1510		+	<i>D. hansenii</i> ISA 1510		-
<i>C. utilis</i>	<i>D. hansenii</i> PYC 2968	+	<i>D. hansenii</i> PYC 2968	<i>C. utilis</i>	-
<i>P. kluyveri</i>		+		<i>P. kluyveri</i>	-
<i>I. terricola</i>		+		<i>I. terricola</i>	-
<i>C. parapsilosis</i>		+		<i>C. parapsilosis</i>	-
					<i>D. hansenii</i> PYC 2968 no apta para consorcios.
					Todas las cepas inhibieron a <i>D. hansenii</i> PYC 2968 a excepción de <i>P. pastoris</i> .

Levadura	Sobre	Efecto	Levadura	Sobre	Efecto
<i>P. pastoris</i>		-	<i>P. pastoris</i>		+
<i>D. hansenii</i> PYC 2968		-	<i>D. hansenii</i> PYC 2968		+
<i>C. utilis</i>	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	+	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>C. utilis</i>	+
<i>P. kluyveri</i>		+		<i>P. kluyveri</i>	-
<i>I. terricola</i>		+		<i>I. terricola</i>	-
<i>C. parapsilosis</i>		+		<i>C. parapsilosis</i>	+
					<i>D. hansenii</i> ISA 1510 apta para formación de consorcios.
					2 combinaciones binarias <i>D. hansenii</i> ISA 1510- <i>C. utilis</i> y <i>D. hansenii</i> ISA 1510- <i>C. parapsilosis</i> .

Levadura	Sobre	Efecto	Levadura	Sobre	Efecto
<i>P. pastoris</i>		-	<i>P. pastoris</i>		+
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	<i>C. utilis</i>	-	<i>C. utilis</i>	<i>D. hansenii</i> PYC 2968	+
<i>D. hansenii</i> ISA 1510		+	<i>D. hansenii</i> ISA 1510		+
					<i>C. utilis</i> apta para formación de consorcios.

<i>P. kluyveri</i>		+		<i>P. kluyveri</i>	+	3 combinaciones
<i>I. terricola</i>		+		<i>I. terricola</i>	-	binarias <i>C. utilis</i> - <i>D. hansenii</i> ISA 1510, <i>C. utilis</i> - <i>P. kluyveri</i> , <i>C. utilis</i> - <i>C. parapsilosis</i> .
<i>C. parapsilosis</i>		+		<i>C. parapsilosis</i>	+	
Levadura	Sobre	Efecto	Levadura	Sobre	Efecto	
<i>P. pastoris</i>		-		<i>P. pastoris</i>	+	<i>P. kluyveri</i> apta para formación de consorcios. 2 combinaciones binarias <i>P. kluyveri</i> - <i>C. utilis</i> , <i>P. kluyveri</i> - <i>I. terricola</i>
<i>D. hansenii</i> PYC 2968		-		<i>D. hansenii</i> PYC 2968	+	
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>P. kluyveri</i>	-	<i>P. kluyveri</i>	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	+	
<i>C. utilis</i>		+		<i>C. utilis</i>	+	
<i>I. terricola</i>		+		<i>I. terricola</i>	+	
<i>C. parapsilosis</i>		-		<i>C. parapsilosis</i>	+	
Levadura	Sobre	Efecto	Levadura	Sobre	Efecto	
<i>P. pastoris</i>		-		<i>P. pastoris</i>	+	<i>I. terricola</i> apta para formación de consorcios. 1 combinación binaria <i>P. kluyveri</i> - <i>I. terricola</i>
<i>D. hansenii</i> PYC 2968		-		<i>D. hansenii</i> PYC 2968	+	
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>I. terricola</i>	-	<i>I. terricola</i>	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	+	
<i>C. utilis</i>		-		<i>C. utilis</i>	+	
<i>P. kluyveri</i>		+		<i>P. kluyveri</i>	+	
<i>C. parapsilosis</i>		-		<i>C. parapsilosis</i>	+	
Levadura	Sobre	Efecto	Levadura	Sobre	Efecto	
<i>P. pastoris</i>		-		<i>P. pastoris</i>	+	<i>C. parapsilosis</i> apta para formación de consorcios. 2 combinaciones binarias <i>C. parapsilosis</i> - <i>D. hansenii</i> ISA 1510, <i>C. parapsilosis</i> - <i>C. utilis</i> .
<i>D. hansenii</i> PYC 2968		-		<i>D. hansenii</i> PYC 2968	+	
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>C. parapsilosis</i>	+	<i>C. parapsilosis</i>	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	+	
<i>C. utilis</i>		+		<i>C. utilis</i>	+	
<i>P. kluyveri</i>		+		<i>P. kluyveri</i>	-	
<i>I. terricola</i>		+		<i>I. terricola</i>	-	

De las 21 combinaciones posibles (Tablas 22, 23), cinco exhiben efecto positivo, se marca en verde cual presentó mayor crecimiento sobre la otra. Se realizó la suma de los diámetros de cada cepa en las combinaciones tendiendo que la combinación *C. utilis* - *C. parapsilosis*, *C. utilis* - *D. hansenii* ISA 1510 tienen la mayor compatibilidad, seguida de la combinación *D. hansenii* ISA

1510- *C. parapsilosis*. Adicionalmente se muestra que de las combinaciones compatibles es posible formular una combinación ternaria con las cepas *D. hansenii* ISA 1510, *C. utilis* y *C. parapsilosis*.

Tabla 23. Resumen de combinaciones y efectos de interacción de las levaduras no-convencionales.

Cepa 1	Cepa 2	Efecto	Díámetro	Díámetro	Suma ± SD (mm)
			cepa 1 (mm)	cepa 2 (mm)	
<i>P. pastoris</i>	<i>D. hansenii</i> PYC 2968	-			
<i>P. pastoris</i>	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	-			
<i>P. pastoris</i>	<i>C. utilis</i>	-			
<i>P. pastoris</i>	<i>P. kluyveri</i>	-			
<i>P. pastoris</i>	<i>I. terrícola</i>	-			
<i>P. pastoris</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-			
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	-			
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	<i>C. utilis</i>	-			
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	<i>P. kluyveri</i>	-			
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	<i>I. terrícola</i>	-			
<i>D. hansenii</i> PYC 2968	<i>C. parapsilosis</i>	-			
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>C. utilis</i>	+	0.57	1.17	1.74±0.424
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>P. kluyveri</i>	-			
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>I. terrícola</i>	-			
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>C. parapsilosis</i>	+	0.78	0.815	1.595±0.025
<i>C. utilis</i>	<i>P. kluyveri</i>	+	0.62	0.9	1.52±0.198
<i>C. utilis</i>	<i>I. terrícola</i>	-			
<i>C. utilis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	+	1.055	0.76	1.815±0.209
<i>P. kluyveri</i>	<i>I. terrícola</i>	+	0.555	0.905	1.46±0.247
<i>P. kluyveri</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-			
<i>I. terrícola</i>	<i>C. parapsilosis</i>	-			

En base al análisis antes realizado se seleccionaron 4 consorcios microbianos no competentes entre sí, el criterio para la selección fue el mayor radio de crecimiento considerando a menor desviación estándar, por lo cual se descarto *C. utilis* y *D. hansenii* ISA 1510, debido a que la dispersión de los datos es muy grande a pesar de tener el segundo mayor crecimiento. En base a

esto se seleccionó *C. utilis* y *C. parapsilosis*, *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis*, *P. kluyveri* e *I. terricola*, el consorcio triple *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510. Para tener mayor certeza en el consorcio a utilizar se realizaron unas pruebas exploratorias a nivel matraz.

5.4.1 Pruebas exploratorias a nivel matraz

Dentro de los resultados anteriores, se observó que la mayor producción de ácido eláxico se obtuvo en los medios de fermentación con fresa. Por las características físicas de la fresa es posible obtener más extracto y se puede obtener por más meses durante el año a costos más económicos respecto a la zarzamora, por lo que se decidió trabajar únicamente con fresa para los próximos experimentos, incluyendo las pruebas exploratorias.

Se evaluaron todos los parámetros característicos de una cinética durante 24 horas. El crecimiento celular el cual tuvo un comportamiento normal para las cuatro cinéticas, sin ningún dato destacar, así como el consumo de azúcares reductores, y el pH se mantuvo en un intervalo de 5 a 4, llegando a ser el pH más ácido. Por lo tanto, el análisis de estas pruebas exploratorias se basó en la actividad enzimática de Tanasa, β -glucosidasa y la determinación de ácido eláxico por HPLC.

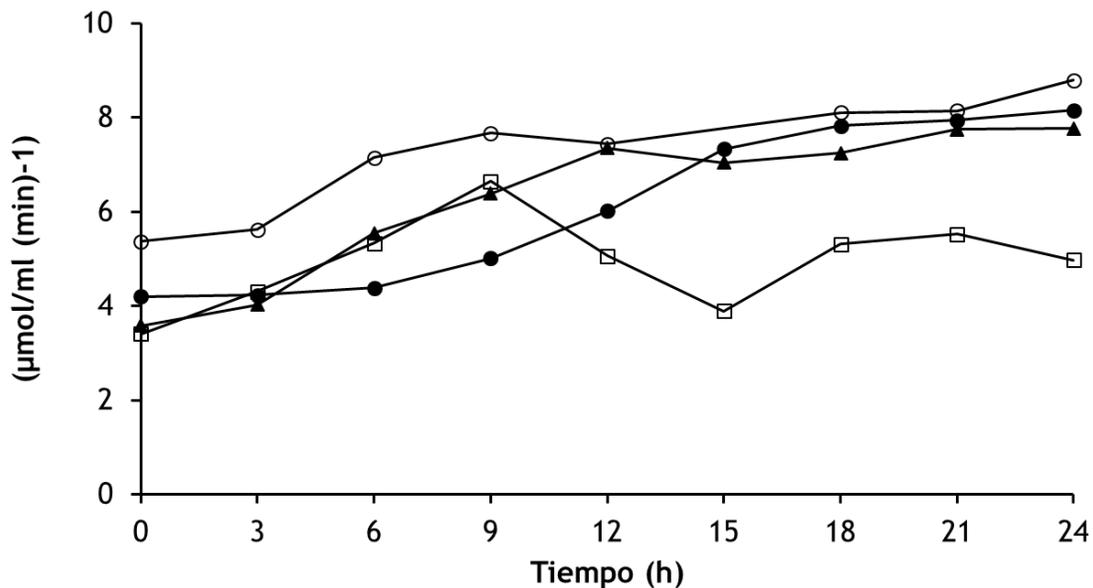


Figura 33. Actividad enzimática β -glucosidasa en: C1 *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (\blacklozenge), C2 *C. utilis* y *C. parapsilosis* (\blacktriangle), C3 *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510 (\blacktriangle) y C4 *P. kluyveri* e *I. terricola* (\square).

En la Figura 33 se observa la actividad enzimática β -glucosidasa, la cinética correspondiente a *P. kluyveri* e *I. terricola*, presenta una disminución la actividad a partir de la hora 9 hasta la hora 15, despues comienza a aumentar sin embargo no llega a los niveles alcanzados por las otras 3 cinéticas, las cules se mantienen con un comportamiento similar entre sí, con un ligero aumento a partir de la hora 12, y se mantiene hasta el final de la cinética. Esto es un indicio postivo ya que tiene una estabilidad, sin embargo aun no se puede hacer una decisión.

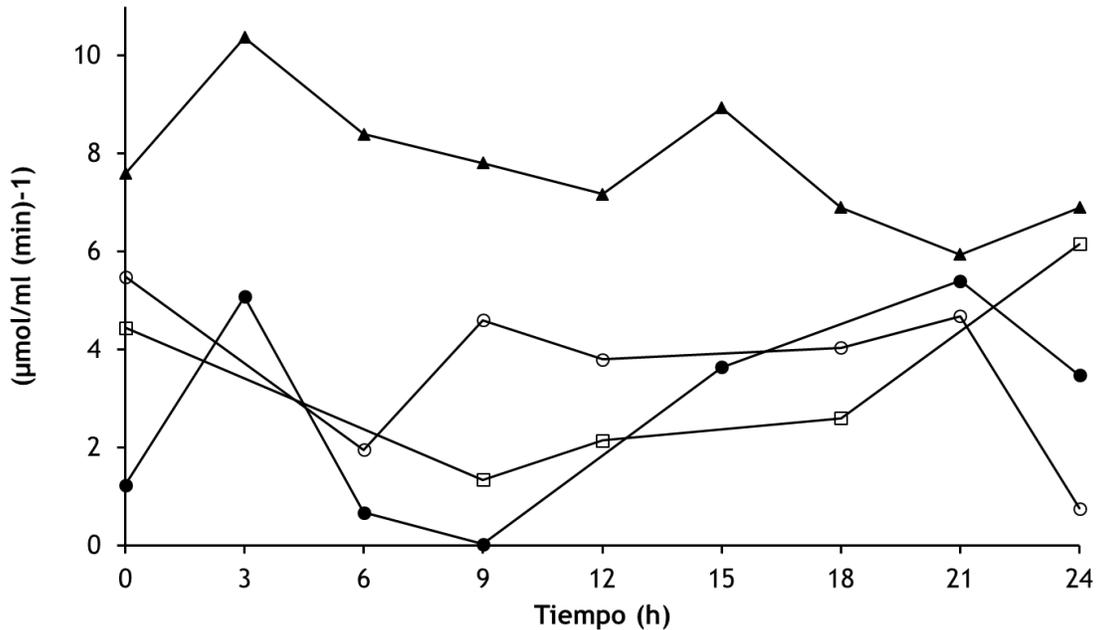


Figura 34. Actividad enzimática de Tanasa en: C1 *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (○), C2 *C. utilis* y *C. parapsilosis* (●), C3 *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510 (▲) y C4 *P. kluyveri* e *I. terricola* (□).

La Figura 34 corresponde a la actividad enzimática de Tanasa, en donde se puede apreciar que el comportamiento de *C. utilis* y *C. parapsilosis* (C2) y *P. kluyveri* e *I. terricola* (C4), tienen un comportamiento similar, con una disminución a la hora 3 hasta la hora 12 donde hay un aumento considerable, por otra parte *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (C1), su actividad disminuye desde el inicio de la cinética, recuperándose en la hora 9 a partir de la cual se mantiene estable hasta la hora 21, con una drástica disminución hasta el final de la cinética. Destaca el consorcio triple de *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510, el cual presenta una tendencia a disminuir de manera paulatina, y se mantiene en valores de actividad enzimática mayores respecto a las otras tres cinéticas.

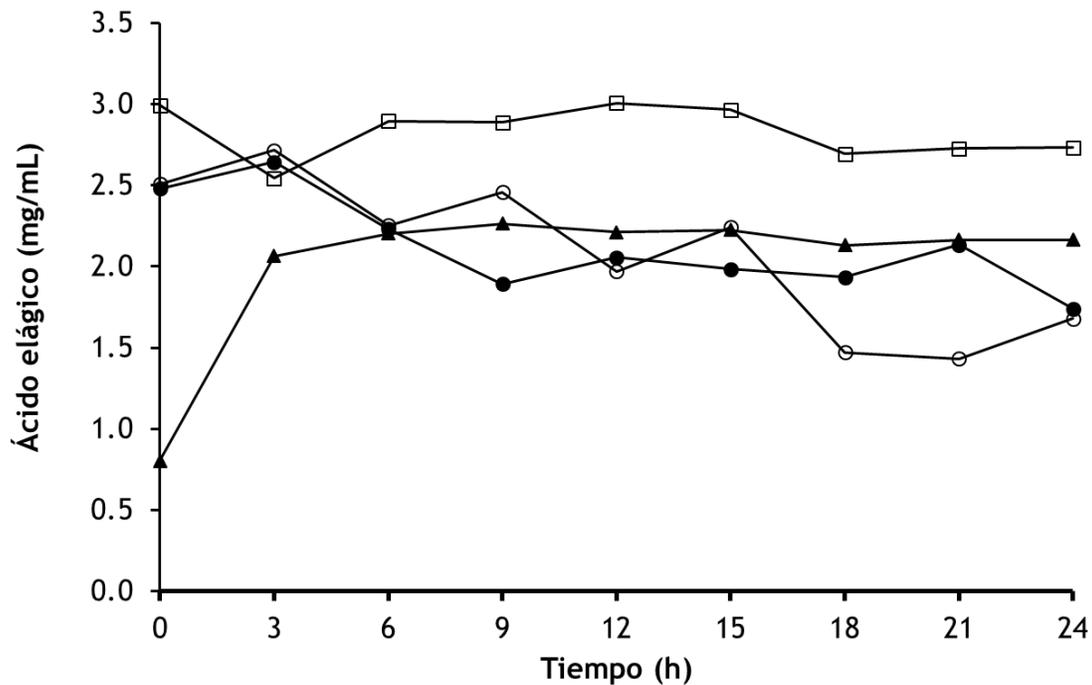


Figura 35. Producción de ácido elágico en: C1 *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (◻), C2 *C. utilis* y *C. parapsilosis* (●), C3 *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510 (▲) y C4 *P. kluyveri* e *I. terricola* (○).

La producción de ácido elágico por HPLC, se observa en Figura 35, esta cuantificación es la más importante de todo el proceso, ya que el objetivo es mejorar la producción de ácido por medio de un consorcio, *C. utilis* y *C. parapsilosis* (C2), *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis* (C1), la cantidad de ácido presente en el medio va disminuyendo paulatinamente durante toda la cinética, para el caso *P. kluyveri* e *I. terricola* (C4), presenta los valores más altos de producción así como estabilidad, sin embargo, en relación con actividad enzimática no es así, por lo cual nos inclinamos por el consorcio triple *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510, porque su producción aumenta desde la hora 3 y se mantiene totalmente estable durante todo el proceso en 2 mg de ácido gálico/mL de metanol, y además las actividades enzimáticas cuantificadas son favorables para el proceso.

5.4.2 Nuevo diseño experimental

En el programa estadístico Statgraphics® se realizó un diseño de experimentos de mezclas simplex-lattice, con tres variables las cuales corresponden a las tres levaduras no-convencionales

seleccionadas. Como variable de respuesta se analizó la cantidad de ácido elálgico determinado por HPLC. Las corridas totales del diseño fueron 10, considerando 3 puntos centrales y los vértices.

Tabla 24. Diseño de mezclas simplex-lattice con las levaduras como variables, se consideraron 3 punto centrales y los vértices.

Corrida	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	<i>C. utilis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
1	0	0.5	0.5
2	0.333333	0.333333	0.333333
3	0	0	1
4	0.166667	0.166667	0.666667
5	0.5	0.5	0
6	0.166667	0.666667	0.166667
7	0.666667	0.166667	0.166667
8	0.5	0	0.5
9	1	0	0
10	0	1	0

Se utilizaron 1200 mL de extracto de fresa lo cual es equivalente a 6.5 mg de elagitaninos, en 2000 mL de medio de cultivo.

5.4.3 Crecimiento celular en nuevo diseño experimental

El crecimiento celular de la mezcla de las levaduras fue comparado con los puntos puros del diseño, el comportamiento fue característico de las levaduras, por lo cual se muestran en la Figura 36 la velocidad específica de crecimiento de las corridas del diseño experimental.

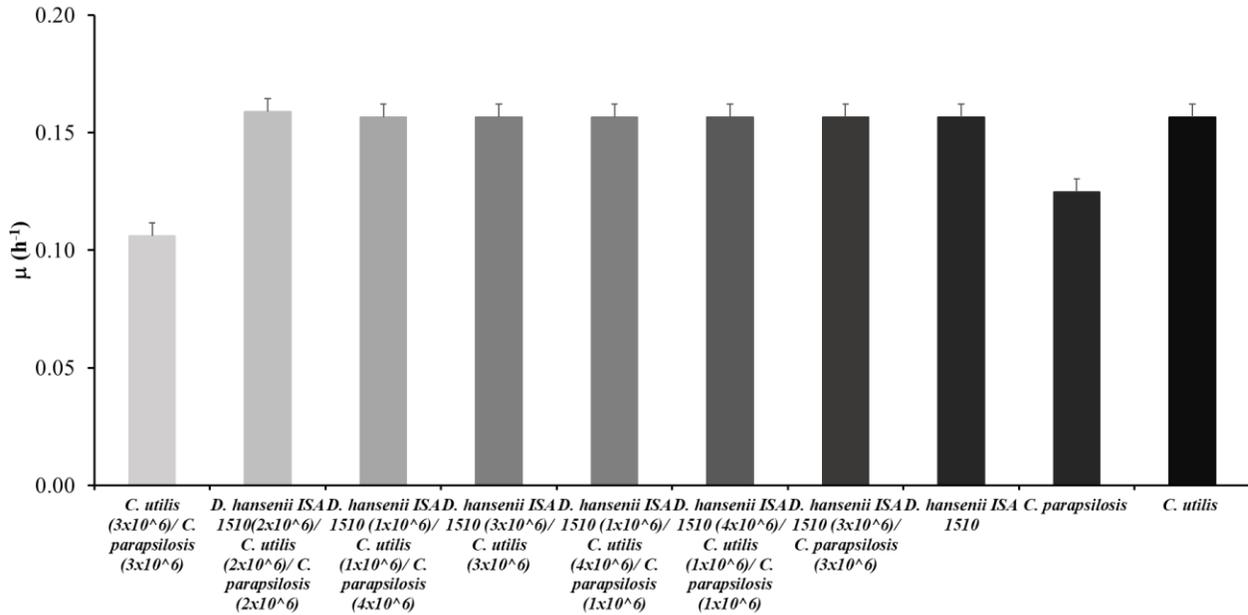


Figura 36. Velocidad específica de crecimiento de las corridas del diseño de experimentos de mezclas para la producción de ácido elágico mediante la hidrólisis de elagitaninos provenientes de Fresa.

A excepción del consorcio de *C. utilis* con *C. parapsilosis*, y el punto puro de *C. parapsilosis*, las velocidades son muy parecidas entre sí, indicando que el metabolismo de las levaduras en estado puro y en consorcio no se ve afectado por las condiciones del medio, específicamente de los elagitaninos, los cuales están siendo metabolizados. Sin embargo, con esta grafica no se puede apreciar si el efecto es negativo o positivo del sustrato sobre la levadura, por lo cual se presenta en la Figura 37 los tiempos de duplicación.

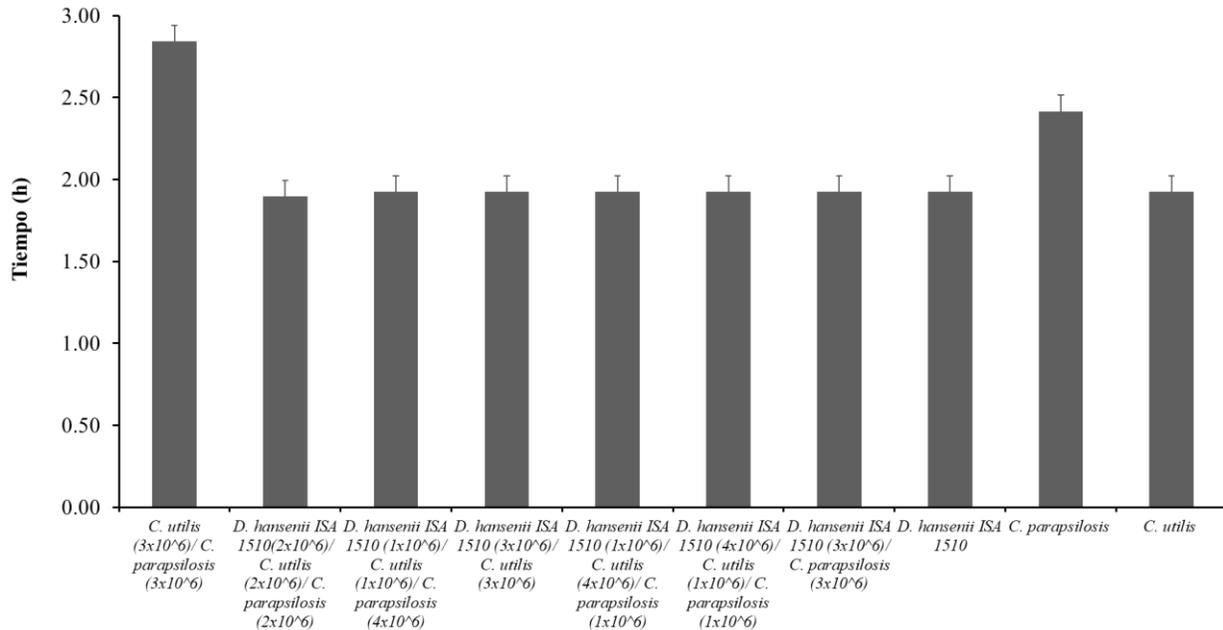


Figura 37. Tiempo de duplicación de las corridas del diseño de experimentos de mezclas para la producción de ácido eláxico mediante la hidrólisis de elagitaninos provenientes de Fresa.

Como se aprecia el sustrato utilizado tuvo un efecto positivo sobre el metabolismo de las levaduras, que además son resultados que pueden ser comparados con los puntos puros del experimento. Respecto a los resultados del primer diseño de experimentos que se realizó, *C. utilis* y *D. hansenii* ISA 1510 tuvieron 2.86 h y 2.17 h, respectivamente como tiempo de duplicación, mientras que en este diseño se obtuvo 1.9241 h para ambos casos, observando un efecto positivo del segundo diseño de experimentos, que implica un nuevo consorcio que incluye *C. parapsilosis*. La velocidad de crecimiento es más lenta en el segundo diseño respecto al primero, sin embargo, es constante en un 80% de las corridas del diseño, dando indicio de que el sistema tiene estabilidad.

5.4.4 Actividades enzimáticas: tanasa y β -glucosidasa

Respecto a la actividad enzimática de tanasa como se observa en la figura 38, se comparó una corrida del diseño experimental con los tres puntos puros, *C. parapsilosis* presenta la menor actividad enzimática de tanasa, sin embargo, es la actividad más estable y constante, manteniendo la expresión de la enzima hasta el final de la cinética. La siguiente cinética que presentó cierta tendencia fue *D. hansenii* ISA 1510, la cual comenzó en 8 $\mu\text{mol/mL min}$, en la hora 3 y 9 se expresaron 2.41 y 2.57 $\mu\text{mol/mL min}$ respectivamente, y la hora 6 y de la hora 12 hasta el final de

la cinética la actividad enzimática oscilo entre 4 y 5.5 $\mu\text{mol}/\text{mL min}$. *C. utilis*, presentó la mayor actividad a la hora 9 de fermentación, sin embargo, no fue estable ya que a partir de la hora 12 disminuyó paulatinamente hasta el final de la cinética. Este mismo comportamiento lo presentó el consorcio triple *D. hansenii* ISA 1510(2×10^6), *C. utilis* (2×10^6), *C. parapsilosis* (2×10^6), donde la máxima expresión fue a la hora 9 superando lo expresado por *C. utilis*, disminuyendo hasta 0 $\mu\text{mol}/\text{mL min}$ a la hora 24 de la cinética.

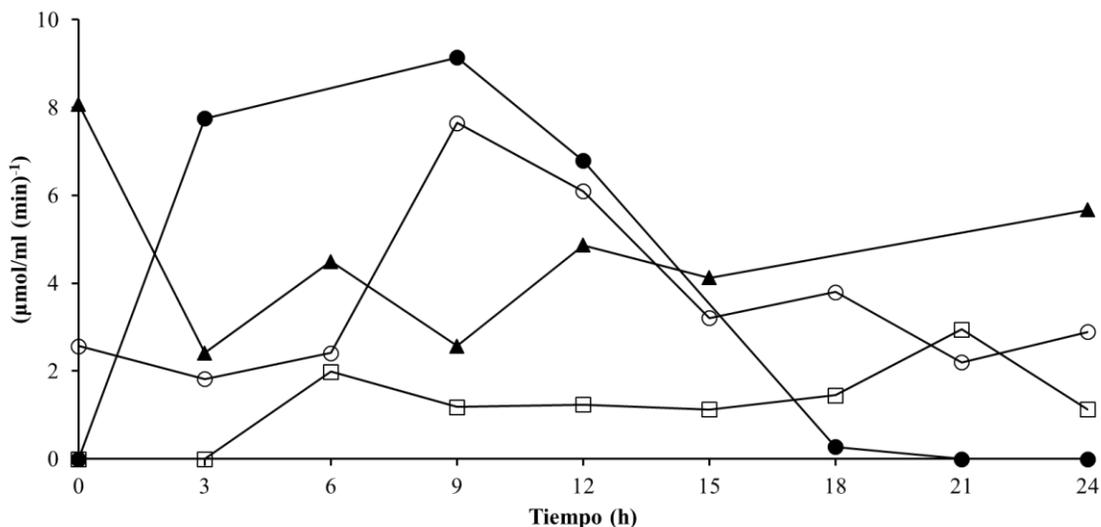


Figura 38. Actividad enzimática de tanasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales: *D. hansenii* ISA 1510(2×10^6) / *C. utilis* (2×10^6) / *C. parapsilosis* (2×10^6) (●); *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6) (▲); *C. utilis* (2×10^6) (○); *C. parapsilosis* (2×10^6) (◻).

Respecto a la actividad enzimática de β -glucosidasa se muestra en la Figura 39, la mayoría de las corridas son estables y se mantienen constantes hasta el final de la cinética, *D. hansenii* ISA 1510 (4×10^6), *C. utilis* (1×10^6) y *C. parapsilosis* (1×10^6); *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (4×10^6), y *C. parapsilosis* (1×10^6), así como la cinética de *D. hansenii* ISA 1510, tuvieron menor actividad enzimática respecto a las otras cinéticas, oscilando entre los mismos valores y presentando una tendencia similar, el consorcio de *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (1×10^6) y *C. parapsilosis* (4×10^6) y el punto puro *C. parapsilosis*, tuvieron valores similares de actividad así como la misma tendencia, mientras que el consorcio de *D. hansenii* ISA 1510 (2×10^6), *C. utilis* (2×10^6) y *C. parapsilosis* (2×10^6), fue similar al punto puro de *C. utilis*, cuyas actividades fueron

las mayores, y presentaron una disminución paulatina a partir de la hora 15 para *C. utilis* y de la hora 18 para el consorcio, esto puede deberse a inhibición por producto.

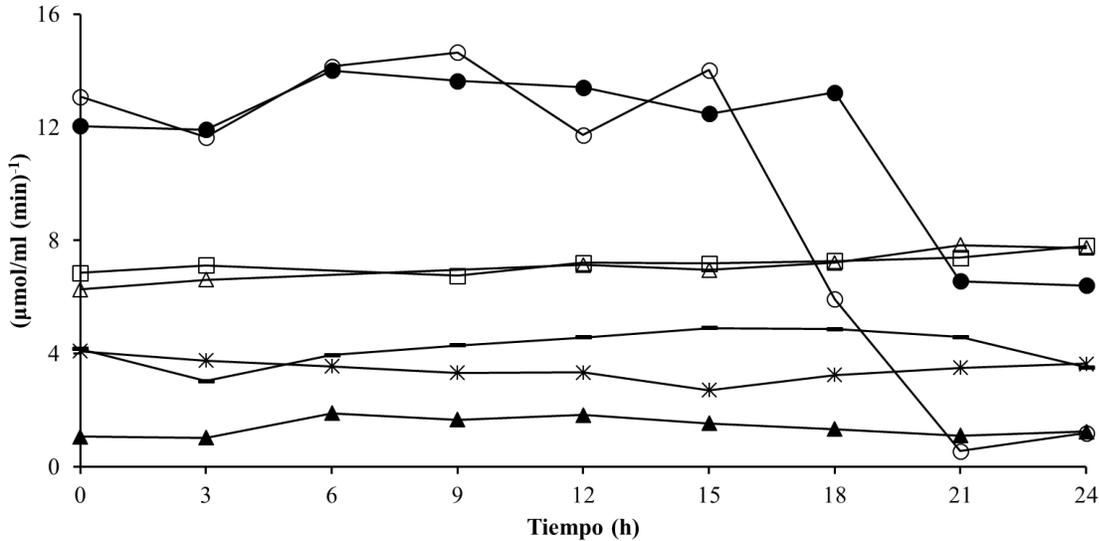


Figura 39. Determinación de la actividad b-glucosidasa durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales: *D. hansenii* ISA 1510(2×10^6)/ *C. utilis* (2×10^6)/ *C. parapsilosis* (2×10^6) (●); *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6)/ *C. utilis* (1×10^6)/ *C. parapsilosis* (4×10^6) (△); *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6)/ *C. utilis* (4×10^6)/ *C. parapsilosis* (1×10^6) (*); *D. hansenii* ISA 1510 (4×10^6)/ *C. utilis* (1×10^6)/ *C. parapsilosis* (1×10^6) (◻); *D. hansenii* ISA 1510 (▲); *C. utilis* (○); *C. parapsilosis* (◻).

En comparación con los resultados obtenidos en el primer diseño de biorreactor, no hay diferencia significativa entre la cantidad de actividad enzimática obtenida ya que en ambos diseños se obtuvieron en el intervalo de 4 h y 12 h, y solamente se puede destacar la tendencia y estabilidad de los resultados, en donde se mejoraron estos aspectos en el segundo diseño.

5.4.5 Evaluación de la producción de ácido elágico por HPLC

La cantidad de ácido elágico obtenido en este segundo diseño experimental se presentan en la Tabla 25, cuyo promedio de las 0 a 24 horas son expresados, en donde el valor más bajo es de 1.3451 mg/mL correspondiente a la corrida *D. hansenii* ISA 1510 (3×10^6), *C. utilis* (3×10^6), comparado con la corrida del diseño 1, *D. hansenii* ISA 1510 (1.5×10^6), *C. utilis* (1.5×10^6) que obtuvo 0.1510 mg/mL, siendo casi nueve veces la diferencia de la concentración de ácido obtenido. La mejor corrida fue *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (1×10^6), *C. parapsilosis* (4×10^6) con la que se

obtuvo 2.8242 mg/mL de ácido elálgico, siendo casi seis veces mayor que la corrida correspondiente del diseño 1 *D. hansenii* ISA 1510 (0.5×10^6), *C. utilis* (0.5×10^6), *P. pastoris* (2×10^6).

Tabla 25. Resultados de ácido elálgico cuantificado por HPLC de los dos diseños experimentales utilizados en la experimentación. Los resultados son expresados como el promedio de la hora 0 a la hora 24 de cada cinética

Diseño experimental 1		Diseño experimental 2	
Corrida	Ácido elálgico (mg/mL)	Corrida	Ácido elálgico (mg/mL)
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (0.5×10^6), <i>C. utilis</i> (0.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (2×10^6)	0.4768	<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1×10^6), <i>C. utilis</i> (1×10^6), <i>C. parapsilosis</i> (4×10^6)	2.8242
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (1.5×10^6)	0.1508	<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (3×10^6), <i>C. parapsilosis</i> (3×10^6)	2.0277
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (0.5×10^6), <i>C. utilis</i> (2×10^6), <i>P. pastoris</i> (0.5×10^6)	0.1097	<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1×10^6), <i>C. utilis</i> (4×10^6), <i>C. parapsilosis</i> (1×10^6)	1.6998
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1×10^6), <i>C. utilis</i> (1×10^6), <i>P. pastoris</i> (1×10^6)	0.1003	<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (2×10^6), <i>C. utilis</i> (2×10^6), <i>C. parapsilosis</i> (2×10^6)	2.1223
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (2×10^6), <i>C. utilis</i> (0.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (0.5×10^6)	0.5022	<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (4×10^6), <i>C. utilis</i> (1×10^6), <i>C. parapsilosis</i> (1×10^6)	2.2068
<i>C. utilis</i> (1.5×10^6), <i>P. pastoris</i> (1.5×10^6)	0.6873	<i>C. utilis</i> (3×10^6), <i>C. parapsilosis</i> (3×10^6)	1.9244
<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (1.5×10^6), <i>C. utilis</i> (1.5×10^6)	0.1501	<i>D. hansenii</i> ISA 1510 (3×10^6), <i>C. utilis</i> (3×10^6)	1.3451
<i>D. hansenii</i> ISA 1510	0.7361	<i>D. hansenii</i> ISA 1510	2.0953
<i>P. pastoris</i>	0.553	<i>C. parapsilosis</i>	1.9478
<i>C. utilis</i>	0.6273	<i>C. utilis</i>	2.1963

La mayor diferencia se presentó entre las corridas *D. hansenii* ISA 1510 (2×10^6), *C. utilis* (2×10^6), *C. parapsilosis* (2×10^6) y *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (1×10^6), *P. pastoris* (1×10^6), donde el segundo diseño es más de veinte veces mayor respecto a que lo que se obtuvo con el primer diseño. Además, los puntos puros de *D. hansenii* ISA 1510 y *C. utilis* se obtuvieron mayores cantidades con el segundo diseño, indicando que los factores que se cambiaron si mejoraron el proceso, dentro de los factores que se cambiaron fue: el uso de *C. parapsilosis* en vez de *P. pastoris*, se aumentó la concentración celular de 3×10^6 a 6×10^6 , y se aumentó la concentración de elagitaninos.

En la Figura 40, se muestra la cantidad de ácido elágico que se produce durante toda la fermentación, en donde se comparan los puntos puros con el consorcio triple que obtuvo mayor cantidad de ácido elágico como promedio. Se observa que la producción de ácido de *D. hansenii* ISA 1510 y *C. parapsilosis*, tiene tendencia a aumentar conforme pasan las horas de cinética, para *C. utilis* se observa un aumento a partir de la hora 6 y hasta la hora 15. Además de destaca el consorcio triple ya que la menor cantidad de ácido elágico es en la hora 3 con 2.53 mg/mL, y su máximo es en la hora 12 con 3 mg/mL de ácido elágico.

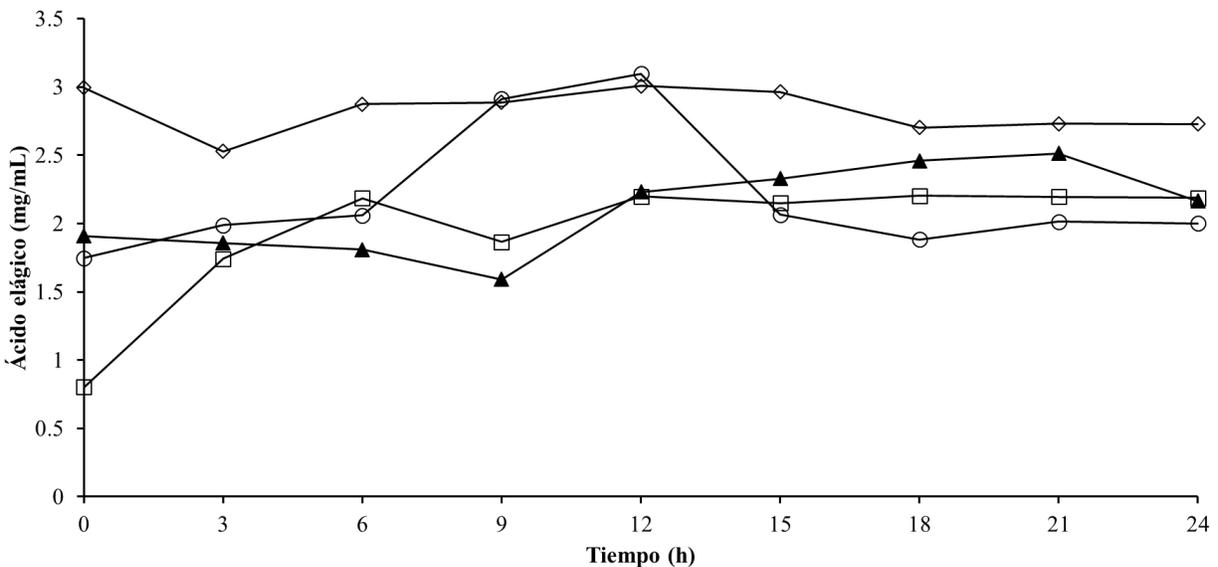


Figura 40. Producción de ácido elágico durante el proceso de fermentación a nivel biorreactor utilizando un consorcio microbiano con las levaduras no-convencionales: *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (1×10^6), *C. parapsilosis* (4×10^6) (◆); *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6) (▲); *C. utilis* (1×10^6) (○); *C. parapsilosis* (4×10^6) (◻).

Es importante realizar el análisis estadístico para observar la superficie de respuesta para determinar si es mejor utilizar un consorcio de levaduras o es mejor utilizar cultivos puros, además de conocer las condiciones adecuadas para el proceso.

5.4.6 Análisis estadístico

Se ajustaron tres diferentes modelos a los datos de ácido elágico, que fue el lineal, cuadrático y cúbico especial, de los cuales de acuerdo con el valor-P, mediante el cual se prueba cual es el modelo estadísticamente más significativo, se seleccionó el modelo cúbico especial, ya que su valor-P está más cerca del 95% de confianza, respecto a los otros dos modelos.

De acuerdo con el Análisis de Varianza (ANOVA), el valor-P para este modelo es mayor o igual que 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre Ácido elágico y los componentes, con nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R^2 indica que el modelo, así ajustado, explica 62.2498% de la variabilidad en Ácido elágico. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0.404095. Puesto que el valor-P es mayor que 5.0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con nivel de significancia del 5.0%.

En la Figura 41 se muestran los contornos de la superficie de respuesta de la producción de ácido elágico, donde se observa que la menor producción de ácido elágico es cuando no se utiliza *C. parapsilosis*, mientras que el resto de la respuesta es favorable manteniéndose por arriba de los 2 mg/mL de ácido elágico, indicando que un consorcio triple si es conveniente para la producción de ácido elágico ya que la zona con mayor producción se encuentra casi al centro de la superficie.

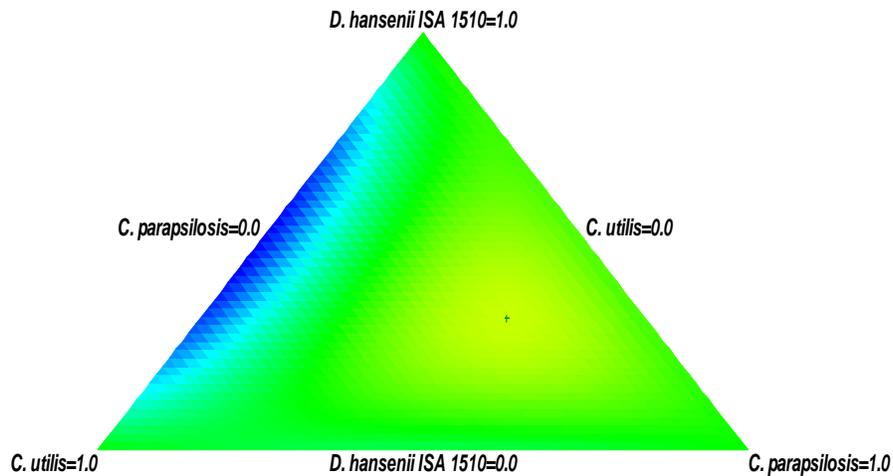


Figura 41. Contornos de la superficie de respuesta estimada con medios de fermentación con elagitaninos provenientes de Fresa, se obtuvieron mediante el análisis estadístico de un diseño de mezclas simplex-lattice mediante el programa Statgraphics®. Ácido elágico (mg/mL): 1.3 (■); 1.46 (■); 1.62 (■); 1.78 (■); 1.94 (■); 2.1 (■); 2.26 (■); 2.42 (■); 2.58 (■); 2.74 (■); 2.9 (■).

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente se consideró que la mejor combinación de levaduras es *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (1×10^6), *C. parapsilosis* (4×10^6), lo cual se puede comparar con los resultados de optimización obtenidos por el programa Statgraphics®, el cual indica que para tener una producción de 2.40 mg/mL se deben de combinar *D. hansenii* ISA 1510 (1.904604×10^6), *C. utilis* (1.27188×10^6), *C. parapsilosis* (2.823516×10^6), indicando que el diseño de mezclas utilizado cubre el punto óptimo para la producción de ácido elágico.

Capítulo IV Conclusiones y recomendaciones

La búsqueda de alternativas para obtener nuevos compuestos que puedan ser benéficos para la salud ha sido encaminada hacia las fuentes vegetales, lo cual ha dado la posibilidad de estudiar las frutas endémicas del estado de Michoacán, destacando la Fresa y la Zarcamora, dándoles un valor agregado. La principal importancia de esta investigación radica en dar a conocer resultados que puedan avalar la composición de las frutillas, principalmente de los compuestos fitoquímicos, los cuales presentan actividad bactericida ante microorganismos como *E. coli* y *S. aureus*, así como actividad antioxidante pudiendo atrapar los radicales libres de ABTS⁺ y DPPH. Además, de estas importantes propiedades mencionadas, se determinó la cantidad de fenoles y flavonoides totales, encontrando que el solvente que obtuvo mayor extracción fue la acetona, concluyendo que la extracción realizada contiene compuestos de carácter polar. Por otra parte, se pudo determinar antocianinas, las cuales son mayoritarias en Zarcamora, además de elagitaninos, los cuales se encuentran principalmente en Fresa, recordando la importancia de los elagitaninos, que fueron utilizados en una etapa posterior de la investigación para la producción de ácido eláxico.

Las siete levaduras no-convencionales evaluadas presentan actividad enzimática de tanasa inducida extracelular, de las cuales destacan *D. hansenii* ISA1510 y *P. pastoris*. El método de detección de tanasa más propicio para esta investigación es la técnica con rodamina, por la estabilidad del complejo formado, lo cual da mayor precisión de los datos obtenidos. La actividad β -glucosidasa fue extracelular y se presentó en las levaduras del género *Candida* y *Pichia* principalmente, siendo los medios con glucosa y sacarosa los de mayor capacidad para inducir la actividad, la cual presentó valores máximos con las cepas *P. pastoris* en el medio suministrado con glucosa, *C. utilis* en el medio con sacarosa y *C. utilis* en celulosa. Para la investigación de elagitanasa se observó que los medios con elagitaninos provenientes de Fresa se hidrolizaron en mayor cantidad para obtener ácido eláxico, se observó que las cepas *P. pastoris* y *D. hansenii* ISA1510 son las que mejor adaptación y desarrollo tuvieron en los medios de Fresa y Zarcamora, sin embargo, la enzima elagitanasa no ha sido elucidada de manera concreta por lo que los resultados presentados en esta investigación le confieren un carácter de estimación, sin embargo no es una parte que pueda concluirse satisfactoriamente, ya que no se tiene el control de la enzima.

La frutilla que mejores resultados generó fue la Fresa, ya que se determinó con anterioridad su mayor contenido de elagitaninos respecto a Zarcamora, lo cual se vio reflejado en el momento

de las fermentaciones obteniendo mayor cantidad de ácido elágico, así como, mayor estabilidad del producto.

De acuerdo con las pruebas de competencia se observó que la cepa *P. pastoris* no es adecuada para consorcios microbianos, mientras que *D. hansenii* PYC ISA 1510, *C. utilis*, *P. kluyveri*, *I. terricola* y *C. parapsilosis* tienen mayor afinidad por el sustrato comparando con las otras levaduras del experimento teniendo un crecimiento y replicación más acelerados comparados con el de las otras levaduras y así obtuvieron el mejor crecimiento. La cinética que consta de la mezcla de las levaduras *C. utilis*, *C. parapsilosis* y *D. hansenii* ISA 1510, fue la seleccionada para las cinéticas de biorreactor principalmente por la concentración de ácido elágico sintetizado y por la estabilidad de la actividad enzimática de β -Glucosidasa y Tanasa.

De manera general se puede concluir que si es factible utilizar levaduras no-convencionales para la producción de ácido elágico, ya que son capaces de generar enzimas que puedan degradar los elagitaninos, encontrando las condiciones adecuadas para la producción del compuesto que son *D. hansenii* ISA 1510 (1×10^6), *C. utilis* (1×10^6), *C. parapsilosis* (4×10^6).

Capítulo V. Referencias bibliográficas

- ✓ Aaby K, Mazur S, Nes A, Skrede, G. (2012). Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. *Food Chemistry*, 132 (1), 86-97.
- ✓ Aguilar-Zárate, P, Chávez-González, ML, Rodríguez-Herrera, R, Aguilar, CN. (2013). Biotechnological production of gallic acid. Handbook on Gallic Acid: *Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications*.
- ✓ Aguilera- Carbó AF, (2009). Producción de ácido elágico: Estudios enzimáticos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- ✓ Aguilera-Carbo A, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E, Aguilar CN. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78: 189–199.
- ✓ Ahire V, Mishra KP. (2017). Ellagic acid as a potential anti-cancer drug. *International Journal of Radiology and Radiation Therapy*, 3: 00063.
- ✓ Ahmed T, Setzer WN, Nabavi SF, Orhan IE, Braidy N, Sobarzo-Sanchez E, Nabavi SM. (2016). Insights into effects of ellagic acid on the nervous system: a mini review. *Current Pharmaceutical Design*, 22: 1–11.
- ✓ Akiyama H, Fujii K, Yamasaki O, Oono T, Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48:487-491.
- ✓ Alothman M, Bhat R, Karim AA. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 115: 785–788.
- ✓ Amil-Ruiz F, Blanco-Portales R, Muñoz-Blanco J, Caballero JL. (2011). The strawberry plant defence mechanism: a molecular review. *Plant and Cell Physiology*, 52: 1873–1903.
- ✓ Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg, FM. (2001). Walnut polyphenols inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation. *Journal of Nutrition*. 131: 2837-2842.
- ✓ Andrade Esquivel E, Morales Guzmán J, Ortiz Calderón AL, Rodríguez García M V, Ronquillo Vázquez A, Sánchez Serrano AC, Rodríguez Damián AR, Guzmán SH. (2006).

- Análisis de las propiedades fisicoquímicas de la Zarzamora en variedades *Brazos*, *Cherokee* y *Tupy* de la zona alta de Michoacán.
- ✓ Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst*, 125: 989-1009.
 - ✓ Aoki K, Shinke R, Nishira H. (1976). Purification and some properties of yeast tannase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40: 79-85.
 - ✓ Arellano Gómez L, Saucedo Veloz C, Arévalo Galarza L. (2005). Cambios bioquímicos y fisiológicos durante la maduración de frutos de zapote negro (*Diospyros digyna Jacq.*). *Agrociencia*, 39 (2), 173-181.
 - ✓ Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Aruoma OI. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84: 1553–1561.
 - ✓ Bala I, Bhardwaj V, Hariharan S, Kumar MNVR. (2006). Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40: 206–210.
 - ✓ Batra A, Saxena RK. (2005). Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. *Process biochemistry*, 40 (5), 1553-1557.
 - ✓ Battestin V, Macedo GA. (2007). Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10: 191-199.
 - ✓ Beecher GR. (2003). Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *The Journal of Nutrition*, 133: 3248S–3254S.
 - ✓ Belmares R, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Ramírez-Coronel A, Aguilar CN. (2004). Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37: 857 - 864.
 - ✓ Bradford, MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
 - ✓ Brand-Williams W, Cuvelier M.E, Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food science and technology*. 28 (1), 25-30.

- ✓ Buendía B, Gil MI, Tudela JA, Gady AL, Medina JJ, Soria C. (2010). HPLC–MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3916–3926.
- ✓ Buschle-Diller G, Zeronian SH. (1994). Enzymatic and acid hydrolysis of cotton cellulose after slack and tension mercerization. *Textile Chemist and Colorist*, 26: 17-24.
- ✓ Bushman B, Phillips B, Isbell T, Ou B, Crane J, Knapp S. (2004). Chemical composition of cranberry (*Rubus spp.*) seeds and oils and their antioxidant potential. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7982-7987.
- ✓ Casablanca-Alarcón E, Ríos-Manríquez N, Terrazas-Siles E, Álvarez Aliaga, MT. (2011). β -glucoside production by thermophilic bacteria indigenous to the Bolivian altiplano culture. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13 (1).
- ✓ Cerón Bonilla M. (2008). Extracción, caracterización y estabilidad de antocianinas y otros compuestos antioxidantes obtenidos a partir de zarzamora. Tesis Licenciatura. Ingeniería de Alimentos. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Universidad de las Américas Puebla.
- ✓ Chávez-Madrigal, R, Ruíz-Pompa K, Márquez-López A, González-Hernández JC. (2019). Optimization of the process of synthesis of ellagic acid using non-conventional yeasts. 2019. (En preparación).
- ✓ Clifford MN, Scalbert A. (2000). Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80: 1118–1125.
- ✓ Cordero Otero RR, Ubeda Iranzo JF, Briones-Pérez AI, Potgieter N, Villena MA, Pretorius IS, Rensburg P. (2003). Characterization of the β -Glucosidase activity produced by enological strains of Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Journal of Food Science*, 68: 2564–2569.
- ✓ da Silva Pinto MS, de Carvalho JE, Lajolo FM, Genovese MI, Shetty K. (2010). Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria ananassa Duch*) using in vitro models. *Journal of Medicinal Food*, 13: 1027–1035.
- ✓ Deschamps AM, Lebeault JM. (1984). Production of gallic acid from tannin by bacterial strains. *Biotechnology Letters*, 6: 237–242.

- ✓ Doi S, Shinmyo A, Enatsu T, Terui G. (1973). Growth-associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae*. *Journal of Fermentation Technology*, 51, 768-774.
- ✓ Durling N, Catchpole O, Grey J, Webby R, Mitchell K, Foo L, Perry N. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol–water mixtures. *Food Chemistry*, 101: 1417–1424.
- ✓ Field JA, Lettinga G. (1992). Toxicity of tannic compounds to microorganisms. In Plant polyphenols. *Springer*, Boston, MA, 673-692.
- ✓ Finn CE, Kempler C, More PP, Strik BC, Yorgey BM, Martin RR, Galletta GJ. (2011). “Sweet Bliss” Strawberry. *Hort Science*, 46 (12): 1701-1705.
- ✓ Fonseca-García L, Calderón-Jaimes L, Rivera M. (2014). Capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en café y subproductos del café producido y comercializado en norte de Santander (Colombia). *Vitae*, 21 (3), 228-236.
- ✓ Gaitan, BDM, Pérez, PLI. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). *Tesis de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia.
- ✓ González-Hernández JC, Alcántar-Covarrubias MA, Cortés-Rojo C. (2015). Producción de trehalosa a partir de levaduras no-convencionales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 14: 11–23.
- ✓ González-Pambo P, Fariña L, Carrau F, Batista-Viera F, Brena BM. (2011). A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*. 46 (1), 385–389.
- ✓ Granados, L, Valderrama, J. (2003). Evaluación de la actividad Proteolítica y Amilolítica de Actinomyces termofílicos aislados a partir de pilas de compost. *Tesis de Microbiología industrial*. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota, Colombia.
- ✓ Gunata, YZ, Bayonove, CL, Arnaud, A, Galzy P. (1990). Hydrolysis of grape monoterpenyl glycosides by *Candida molischiana* and *Candida wickerhamii* β -glucosidases. *Journal of Science of Food and Agriculture* 50, 499–506.

- ✓ Häkkinen SH, Kärenlapi SO, Mykkänen HM, Törrönen AR. (2000). Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage”. *European Food Research Technology*. 212, 75-80.
- ✓ Haslam E, Stangroom J. (1966). The esterase and depsidase activities of tannase. *Biochemistry*, 99: 28-31.
- ✓ Hatamoto O, Watarai T, Kikuchi M, Mizusawa K, Sekine H. (1996). Cloning and sequencing of the gene encoding tannase and a structural study of the tannase subunit from *Aspergillus oryzae*. *Gene*, 175: 215–221.
- ✓ Hayashi T, Maruyana H, Kasai R, Hattori K, Takasuga S, Hazeki O, Yamasaky K, Tanaka T. (2002). Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells. *Letters Plant Medicinal*, 68: 173-175.
- ✓ Hernández LF, Espinosa JC, Fernández-g M, Briones A. (2003). β -glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *International Journal of Food Microbiology*, 80: 171-176.
- ✓ Hernández-Rivera JS. (2008). Producción, purificación y caracterización de la enzima de *Aspergillus niger* GH1 responsable de la hidrólisis del grupo HHDP de los elagitaninos. *Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.*
- ✓ Huang W, Ni J, Borthwick AGL. (2005). Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus niger* SHL 6. *Process Biochemistry*, 40: 1245-1249.
- ✓ Huang W, Niu H, Li Z, He Y, Gong W, Gong G. (2008). Optimization of ellagic acid production from ellagitannins by co-culture and correlation between its yield and activities of relevant enzymes. *Bioresource Technology*, 99(4), 769–775.
- ✓ Huetz P, Mavaddat N, Mavri J. (2005). Reaction between ellagic acid and an ultimate carcinogen. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45:1564-1570.
- ✓ Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4076-4082.
- ✓ Kaponen JM, Happonen A. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1612-1619.
- ✓ Kasieczka-Burnecka M, Kuc K, Kalinowska H, Knap M, Turkiewicz M. (2007). Purification and characterization of two cold-adapted extracellular tannin acyl hydrolases

- from an Antarctic strain *Verticillium sp.* P9. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 77–89.
- ✓ Kays S. (1997). Postharvest physiology of perishable plant products. 1st edition. Exon Press, Athens, GA. 263-278.
 - ✓ Khenouf S, Hassiba Behabdallah, Kamel Ghar Zoudi, Smain Amira, Hideyuki Ito, Tae-Hoon Kim, Takashi, Yoshida y Akila Gharzoul. (2003). Effect of tannins from *Quercus saber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:1469-1473.
 - ✓ Kilic I, Yeşiloğlu Y, Bayrak Y. (2014). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130: 447–452.
 - ✓ Knudson L. (1913). Tannic acid fermentation I. *The Journal of Biological Chemistry*, 14: 159-184.
 - ✓ Lako J, Trenerry VC, Rochfort S. (2008). Routine analytical methods for use in South Pacific regional laboratories for determining naturally occurring antioxidants in food. *International Food Research Journal*. 15 (3), 313-323.
 - ✓ Landete JM. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44: 1150–1160.
 - ✓ Lei Z, Jervis J, Helm RF. (2002). Use of Methanolysis for the Determination of Total Ellagic and Gallic acid Contents of Wood and Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (3), 1165-1168.
 - ✓ Lipińska L, Klewicka E, Sójka M. (2014). The structure, occurrence and biological activity of ellagitannins: a general review. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13: 289–299.
 - ✓ Liu P, Kallio H, Yang B. (2011). Phenolic compounds in hawthorn (*Crataegus grayana*) fruits and leaves and changes during fruits ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59, 11141- 11149.
 - ✓ Losso JN, Bansode RR, Bawadi HA, Truax R. (2004). In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15: 672-67.

- ✓ Luthria DL, Mukhopadhyay S. (2006). Influence of sample preparation on assay of phenolic acids from eggplant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 41–47.
- ✓ Lynd L, Zyl W, McBride J, Laser M. (2005). Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion in Biotechnology*, 16: 577–583.
- ✓ Machado TB, Leal ICR, Amaral ACF, dos Santos KRN, da Silva MG, Kuster RM. (2002). Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Journal Brazilian of Chemistry Society*, 13: 606-610.
- ✓ Mansfiel, SD, Dejong, E, Stephens, RS, Saddler, RN. (1997). Physical characterization of enzymatically modified kraft pulp fibers. *Journal of biotechnology* 57, 205-216.
- ✓ Márquez-López A, Ramírez-Conejo JD, Chávez-Parga MC, González-Hernández JC. (2019). Comparative analysis of enzymatic activity of tannase in non-conventional yeasts to produce ellagic acid. (En revisión).
- ✓ Martínez-Soto G, Mercado-Flores J, López-Orozco M, Prieto-Velásquez B. (2008). Propiedades fisicoquímicas de seis variedades de fresa (*Fragaria ananassa*) que se cultivan en Guanajuato". *Revista Salud Pública y Nutrición*, 8.
- ✓ Masamune A, Satoh, Kazuhiro Kicata, Noriaki Suzuki, Kennichi Satoh, Tooru Shimosegawa. (2008). Ellagic acid blocks activation of pancreatic stellate cells. *Biochemical Pharmacology*, 70: 869-878.
- ✓ McMahan, H, Zoecklein, BW, Fugelsang, K, Jasinski, Y. (1999). Quantication of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 23, 198-203.
- ✓ Miller GL. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. 31(3), 426–428.
- ✓ Mingshu L, Kai Y, Qiang H, Dongying J. (2006). Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal of Basic Microbiology*, 46: 68–84.
- ✓ Naczk M, Shahidi F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
- ✓ Notka F, Meiel G, Wagner R. (2004). Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Research*, 64: 93-102.

- ✓ Novoa RH, Bojacá M, Galvis JA, Fischer G. (2006). La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12°C (*Physalis peruviana L.*). *Agronomía Colombiana*, 24 (1), 77-86.
- ✓ Olaya Zea JA, Restrepo Sánchez LP. (2012). Estudio del contenido de fenoles y actividad antioxidante de guayaba en diferentes estados de madurez. *Acta Biológica Colombiana*, 17(3), 611- 624.
- ✓ Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parilla E, de la Rosa LA, Ramos-Jimenez A. (2014). Taninos Hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición hospitalaria*. 31: 55-66.
- ✓ Pattanayak R, Basak P, Sen S, Bhattacharyya M. (2017). An insight to the binding of ellagic acid with human serum albumin using spectroscopic and isothermal calorimetry studies. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 10: 88–93.
- ✓ Pointing, CA. (1999). Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. *Funga diversity* 2, 17-33.
- ✓ Przewloka SR, Shearer BJ. (2002). The further chemistry of ellagic acid and water-soluble ellagitannins as metal precipitants. *Holzforschung*, 56:13-19.
- ✓ Ramírez-Coronel MA. (2003). A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. *Microbiology*, 149: 2941–2946.
- ✓ Reed JD. (2010). Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73: 1516-1528.
- ✓ Reyes Pillajo IY. (2017). Evaluación de la cantidad antioxidante y antibacteriano de los frutos rojos sobre cepas de *Streptococcus Mutans*: estudio in vitro. Proyecto de investigación presentado como requisito previo a la obtención del título de Odontóloga. Carrera de Odontología. Quito, 65
- ✓ Riou C, Salmon J, Vallier M, Gunata Z, Barrei P. (1998). Purification, characterization, and substrate specificity of a novel highly glucose-tolerant β -glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 3607-3614.
- ✓ Rodríguez, ME, Lopes, CA, Van Broock, M, Vallés, S, Ramón, D, Caballero, AC. (2004). Screening and typing of Patagonian wine yeasts for glycosidase activities. *Journal of Applied Microbiology* 96, 84–95.

- ✓ Rodríguez-Durán LV, Valdivia-Urdiales B, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. (2010). Química y biotecnología de la Tanasa. *Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 2:1-4.
- ✓ Rosi, I, Vinella, M, Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of oenological origin. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 519–527.
- ✓ Ruibal BIJ, Marta Dubed EM, Martínez FL, Noa RE, Vargas GLM, Santana RJL. (2003). Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea moret*. *Revista Cubana de Farmacia*, 37: 1-8.
- ✓ Scalbert A, Williamson G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130: 2073S–2085S.
- ✓ Schulenburg K, Feller A, Hoffmann T, Schecker JH, Martens S, Schwab W. (2016). Formation of β -glucogallin, the precursor of ellagic acid in strawberry and raspberry. *Journal of Experimental Botany*, 67: 2299–2308.
- ✓ Seeram N, Lee R. (2005). Rapid large-scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and purification technology*, 41(1), 49-55.
- ✓ Seeram, NP, Adams, LS, Henning, SM, Niu, Y, Zhang, Y, Nair, MG, Heber, D. (2004). In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 360–367.
- ✓ Seiji D, Atsuhiko S, Toshio E, Gyozo T. (1973). Growth-associated production of tannase by a strain of *Aspergillus oryzae*. *Fermentation Engineering Magazine*, 51: 768-774.
- ✓ Selva M, Carole T, John S, Xingqian Y, Sophia Jun Xue. (2017). Ellagic acid in strawberry (*Fragaria spp.*): Biological, technological, stability, and human health aspects. *Food Quality and Safety*, 1: 227–252.
- ✓ Sepúlveda L, Laredo-Alcalá EI, Genisheva Z, Buenrostro Figueroa JJ. (2017). Producción biotecnológica de ácido elágico a partir de residuos de naranja. XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
- ✓ Serrano R, Kiellandbrandt MC, Fink GR. (1986). Yeast Plasma-Membrane Atpase Is Essential for Growth and Has Homology with $(\text{Na}^{++}\text{K}^+)$, K^+ and Ca^{2+} Atpases". *Nature*, 319 (6055), 689–693.

- ✓ Sharma S, Bhat TK, Dawra RK. (2000). Spectrophotometric method for assay of tannase using rhodamine". *Analytical Biochemistry*. 279, 85-89.
- ✓ Shi N, Qiang H, Kai Y, Huang W, Quin L. (2015). Strawberry phytochemicals inhibit azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colorectal carcinogenesis in Crj: CD-1 mice. *Nutrients*, 7: 1696–1715.
- ✓ Shi, B, He, Q, Yao, K, Huang, W, Li Q. (2005). Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80, 1154–1159.
- ✓ Siegenthaler P, Neuenschwander M, Bradoo S, Gupta R, Saxena RK. (1997). Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry*, 32: 135-139.
- ✓ Silva-Espinoza B, Ortega-Ramírez L, González-Aguilar G, Olivas I, Ayala-Zavala J. (2013). Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de Fresa con aceite esencial de hoja de canela. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36 (3), 217-224.
- ✓ Sim, SL, Hang, YD. (1996) Research Note: Sauerkraut Brine: A Potential Substrate for Production of Yeast β -Glucosidase. *Food Science and Technology* 29, 365–367.
- ✓ Sun J, Chu Y, Wu X, Liu RH. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 7449-7454.
- ✓ Teather, RM, Wood, PJ. (1982). Use of congo red-polysaccharide interaction in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied Environmental Biotechnology* 43, 777-780.
- ✓ Treutter D. (2010). Managing phenol contents in crop plants by phytochemical farming and breeding visions and constraints. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 807–857.
- ✓ Turan, Y, Zheng, M. (2005). Purification and characterization of an intracellular β -glucosidase from Methylophilic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry (Moscow)* 70, 1363-1368.
- ✓ Valencia Sullca CE, Guevara Pérez A. (2013). Elaboración de néctar de zarzamora (*Rubus fruticosus L.*). *Scientia Agropecuaria*, 4(2), 101-109.

- ✓ Vattem D, Shetty K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace mediated by *Lentinus edodes* using solid-state system. *Process Biochemistry*, 39, 367-379.
- ✓ Vázquez-Flores A, Álvarez-Parrilla E, López-Díaz J, Wall-Medrano A. (2012). Hydrolysable and condensed tannins: chemistry, advantages and disadvantages of their intake. *Tecnociencia Chihuahua*, 5: 84-94.
- ✓ Voca S, Sic J, Dobricevic N, Jakobek L, Seruga M, Galic A, Pliestic S. (2014). Variation in the bioactive compound content at three ripening stages of strawberry fruit. *Molecules*, 19, 10370-10385.
- ✓ Vrhovsek U, Guella G, Gasperotti M, Pojer E, Zancato M., Mattivi F. (2012). Clarifying the identity of the main ellagitannin in the fruit of the strawberry, *Fragaria vesca* and *Fragaria ananassa* Duch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 2507–2516.
- ✓ Wilson TC, Hagerman AE. (1990). Quantitative determination of ellagic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38 (8), 1678- 1683.
- ✓ Yanai, T, Sato, M. (1999). Isolation and properties of β -glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture* 50, 231–235.
- ✓ Yuksel S, Koca I. (2008). Color Stability of blackberry nectars during storage Turkey. *Journal of Food Technology*, 97, 166 – 169.
- ✓ Zhang HM, Zhao L, Li H, Xu H, Chen WW, Tao L. (2014). Research progress on the anticarcinogenic actions and mechanisms of ellagic acid. *Cancer Biology and Medicine*, 11: 92–100.
- ✓ Zhang, HP, Himmel, ME, Mielenz JR. (2006). Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances* 4, 452-481.

Capítulo VI. Anexos

Artículo en preparación

Comparative analysis of the enzymatic activity of β -glucosidase in non-conventional yeast to produce elagic acid from fruits

Ramírez-Conejo Juan David¹, Márquez-López Anahí², Chávez-Parga Ma. Del Carmen², y González-Hernández Juan Carlos^{1}*

¹Tecnológico Nacional de México / I. T. Morelia (Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica). Av. Tecnológico 1500. C.P. 58120. Morelia, Michoacán. México. ²Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Mujica S/N. C.P. 58030. Morelia, Michoacán. México. *E-mail: jcgonzal@itmorelia.edu.mx

Artículo en proceso de concluir

Revista Mexicana de Ingeniería Química

Producción de ácido elágico por consorcio mixto de levaduras no-convencionales

Márquez-López Anahí ², Ramírez-Conejo Juan David ¹, Chávez-Madrigal Rafael ¹, Chávez-Parga Ma. Del Carmen ², and González-Hernández Juan Carlos ^{1*}

¹ Tecnológico Nacional de México / I. T. Morelia (Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica). Av. Tecnológico 1500. C.P. 58120. Morelia, Michoacán. México. ² Posgrado de la Facultad de Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Av. Francisco J. Mujica S/N. C.P. 58030. Morelia, Michoacán. México.

Resumen

Esta investigación se basa en el estudio de la degradación enzimática de los elagitaninos, los cuales forman parte de la estructura de la Fresa y la Zarcamora. La degradación es llevada a cabo por las enzimas tanasa y β -glucosidasa provenientes de levaduras no-convencionales, cuya influencia individual y en consorcio mixto se evaluó mediante un diseño de experimentos de mezclas, con el objetivo de determinar la frutilla que genera mayor producción de ácido elágico, así como las mejores concentraciones celulares adecuadas en consorcio mixto y/o individual. La experimentación se llevó a cabo de la evaluación del crecimiento celular, pH, azúcares reductores, proteína, determinación de actividades enzimáticas y elagitaninos, a nivel bioarreactor, además de medir como variable de respuesta del diseño el ácido elágico en HPLC. Se observó que los medios de fermentación que contenían Fresa son los más adecuados para el proceso, obteniendo 0.73 mg/mL de ácido elágico, como valor máximo con cuatro horas de fermentación, mientras que para las corridas de Zarcamora se obtuvieron 0.20 mg/mL de ácido elágico como concentración inicial. Al observar los puntos puros, *D. hansenii* PYC ISA 1510 y *P. pastoris*, presentan una degradación del compuesto, sin embargo, *C. utilis* tiene un comportamiento estable, llegando a producir la máxima cantidad de ácido elágico de todo el diseño experimental, sin embargo *P. pastoris*, presenta los valores más bajos de todo el proceso lo cual se ve reflejado en el análisis del cultivo mixto, el cual no tiene una influencia significativa sobre la respuesta.

Palabras clave: ácido elágico, cultivo puro y mixto, biorreactor, diseño de mezclas.

artículos publicados



Aspectos generales sobre los elagitaninos y su conversión a ácido elágico

*Márquez-López, Anahí ^a; Chávez- Parga, Ma. del Carmen ^a
y Hernández-González, Juan Carlos ^b*

^a Facultad de Ingeniería Química, UMSNH;

^b Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Morelia

Resumen

En la actualidad, gran cantidad de biomoléculas se asocian con propiedades “especiales”, algunas útiles para combatir ciertas enfermedades degenerativas. El ácido elágico y los elagitaninos han logrado gran relevancia debido a la reducción o prevención de enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardíacas, hipertensión, disminución de colesterol, inhibición de bacterias, parásitos y virus, como el VIH y Papiloma. Esto ha propiciado su interés comercial para su consumo como complemento o incluso como medicamento, por lo que la demanda ha ido en aumento en los últimos años. La forma tradicional de obtención de ácido elágico es a través de procesos que involucran sustancias altamente contaminantes como ácidos y álcalis y que además requieren gran cantidad de energía calorífica; esto ha propiciado la búsqueda del desarrollo de procesos biológicos que permitan obtener ácido elágico. Las recientes investigaciones sobre estos procesos se han dirigido hacia fuentes naturales ricas en compuestos fenólicos, como son los elagitaninos, que puedan ser degradados por enzimas provenientes de especies de hongos filamentosos o de hongos levaduriformes, siendo estos últimos la alternativa más novedosa en los últimos años. Debido a esto, se presenta la siguiente revisión para dar una perspectiva general de los últimos avances para la obtención de ácido elágico mediante fermentaciones con levaduras no-convencionales, utilizando como sustrato productos endémicos de la región. Para llegar a este punto es necesario hacer un repaso desde los fundamentos de compuestos fitoquímicos, clasificación, biosíntesis y extracción de los compuestos de interés, posteriormente se destacarán sus principales aplicaciones en el área médica, concluyendo con la revisión de las levaduras no-convencionales como posibles productoras de enzimas.

Palabras clave: ácido elágico, elagitaninos, fuentes naturales, hongos.

Comparative analysis of enzymatic activity of tannase in non-conventional yeasts to produce ellagic acid

Anahí Márquez-López¹, Juan David Ramírez-Conejo², Ma. Del Carmen Chávez-Parga¹, Dora Cecilia Valencia Flores², Miguel Angel Zamudio Jaramillo², Horacio González Rodríguez¹ and Juan Carlos González-Hernández^{2*} 勞

Abstract

Non-conventional yeasts represent an alternative for microorganisms that are capable to produce the enzyme Tannase (EC 3.1.1.20), which has many applications in the food and pharmaceutical industry as it stands out for its ability to produce ellagic acid out of the enzymatic hydrolysis of ellagitannins. Ellagic acid has been studied in the medical area for its action against various diseases, as is the case of cancer or heart problems. The investigation was conducted to evaluate seven unconventional yeasts - *Debaryomyces hansenii* PYC ISA 1510, *Debaryomyces hansenii* PYC 2968, *Candida parapsilosis*, *Candida utilis*, *Pichia pastoris*, *Pichia kluyveri*, *Issatchenkia terricola* - as producers of the enzyme Tannase. This was done in mediums of fermentation with tannic acid (1-3%) and YPD without tannic acid, to determine the activity of the enzyme by two spectrophotometric methods, the first being with rhodamine and the second with methyl gallate, to detect the presence of gallic acid as a product of the hydrolysis of tannic acid. The main results showed that the evaluated non-conventional yeasts all presented activity with the Tannase enzyme, obtaining better detection results with the rhodamine technique for the stability of the formed complex, which gives more precision of the obtained data.

Keywords: non-conventional yeasts; enzymatic activity; tannase; ellagic acid; hydrolysis.

Practical Application: The spectrophotometric determination of strains of non-conventional yeasts capable of producing tannase enzyme allow their use in new biotechnological processes.

1 Introduction

Ellagic acid is a polyphenolic compound obtained by the degradation of ellagitannins present in various fruits and plants, which has a lot of applications in various areas such as nutraceutical, pharmaceutical, cosmetic and food industry (Vázquez-Flores et al., 2012). A large amount of investigation has been carried out to produce ellagic acid where three main factors have been considered, degrading enzymes of ellagitannins such as tannase (EC 3.1.1.20) and β -glucosidase (EC 3.2.1.21), filamentous fungi of the genus *Aspergillus* that are the principal producing organisms of these enzymes, and different vegetal sources rich in ellagitannins. The use of fungi entails an increase in the amount of substrate required for their growth and a longer time for fermentation, which in turn has an impact on the energy costs. For these disadvantages, the investigation is developing alternatives to improve said process, using non-conventional yeasts as microorganisms that produce the enzymes of interest, reducing fermentation time, costs of maintenance, and adaptation of microorganisms.

The investigations that have been carried out on the production of tannase in yeasts are very scarce. Aoki et al. (1976) began reporting the production, purification and characterization of the enzyme tannase of a *Candida* yeast sp. K-1. Albertse (2002)

managed to express the tannase gene from *A. oryzae* in a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Zhong et al. (2004) cloned and expressed the tannase gene from *A. oryzae* in the yeast *Pichia pastoris*, and Shi et al. (2005) found tannase activity in the *C. utilis* strain. This investigation seeks to expand the information about the production of tannase in non-conventional yeast strains that have not been reported in the literature, pointing out that these strains have not been genetically modified.

The yeasts that are detected with the highest enzymatic activity, will be used to produce ellagic acid by means of a fermentation process. Using the enzymatic function of hydrolysis of the tannase, on the ester bonds that bind the hexahydroxydiphenic acid molecules (HHDP) with the glucose molecule, to then undergo a spontaneous lactonization of the HHDP molecule, to product of interest is obtained. Tannase is known as an enzyme that hydrolyses the tannic acid ester to give gallic acid and glucose. On the presence of tannase, the ester linkages between the HHDP and glucose groups that make up the ellagitannins in strawberry and blackberry should be broken. The non-conventional yeasts are an option to produce ellagic acid through the enzymatic activity for tannase. On the present investigation, presence

Extract of Ellagitannins starting with Strawberries (*Fragaria sp.*) and Blackberries (*Rubus sp.*)

Anahí MÁRQUEZ-LÓPEZ¹, Fernando AYALA-FLDRES², Stolishnaya MACÍAS-PURECD², Ma. del Carmen CHÁVEZ-PARGA¹, Dora Cecilia VALENCIA FLDRES², Rafael MAYA-YESCAS¹, Juan Carlos GDNZÁLEZ-HERNÁNDEZ^{2*} 茭

Abstract

Characterize the content of phytochemical compounds present in samples of extracts of strawberry (*Fragaria sp.*) and blackberry (*Rubus sp.*). The extraction of said compounds was carried out with solutions of polar solvents, such as acetone, ethanol and methanol, using an experimental design with three factors: state of maturity, resting time and temperature. The characterization of these fruits is the beginning of the utilization mainly of ellagitannins to produce ellagic acid. Total phytochemical content was determined by spectrophotometric techniques, for phenolic content it was used Folin-Ciocalteu, for flavonoids it was determined with aluminium chloride, the antioxidant activity was evaluated by the methods of DPPH and ABTS⁺, the bactericidal effect of the extracts was shown for strains of *E. coli* and *S. aureus*. The determination of ellagitannins was performed by spectrometry. The influence of the state of maturity on the response variable was evaluated; it was observed that concentration of phytochemicals increases proportionally to maturity stage. The antioxidant activity was evaluated, determining that extracts obtained exhibit 94% - 95% inhibition. The determination of ellagitannins, finding that the highest concentration of ellagitannins was found in a state of green maturity, for strawberries as well as blackberries.

Keywords: ellagitannins; strawberries; blackberries; phytochemicals.

Practical application: Phytochemical characterization of strawberry and blackberry endemic to the state of Michoacán, highlighting the obtaining of ellagitannins for use in processes of obtaining ellagic acid.

1 Introduction

Polyphenols are a large group of substances with different chemical structures and activities, which are important constituents of plants and give them many beneficial effects. Especially these components can exert antioxidant effect, such as the sequestration of free radicals, donating hydrogen molecules, clearing of superoxide molecules, chelating transition metals. These properties are attributed mainly to the hydroxyl group present in its structural ring; tannins are distributed in roots, stems, bark, trunk, leaves, flowers, fruits and seeds. Tannins are soluble in water, exhibit high molecular weights from 500 Da to 3000 Da, and possess sufficient hydroxyl groups attached to phenolic structures that confer them the characteristic of forming complexes with proteins, minerals and other macromolecules. There exist two groups of tannins: condensed and hydrolysable tannins, hydrolysable tannins, such as gallotannins or ellagitannins, come from the esterification of non-flavonoid polyphenolic compounds, such as gallic or ellagic acid, respectively (Vázquez-Flores et al., 2012).

Ellagitannins are a large group of polyphenolic compounds widely distributed in plants (Seeram et al., 2005), their structure exhibit great variability since there are multiple places where the unit of ellagic acid can be linked with the glucose molecule (Batra & Saxena, 2005). The study, application and interest in obtaining these compounds lies

in the therapeutic effects that are primary in its hydrolysed form, ellagic acid (Huang et al., 2008), which has many important applications, such as antioxidant, antimicrobial, antiviral and antitumor (Seeram et al., 2005). However, the application of ellagic acid has not been exploited due to its high cost of production, both with chemical methods using acid hydrolysis, as well as with biotechnological processes, using high cost enzymes and vegetable matter to extract the scarcely available ellagitannins in the region.

In this work, the study of strawberries and blackberries, endemic to the State of Michoacán, was carried out. These two berries are among the fruits with the highest levels of antioxidants, adjudged to the content of vitamin C, anthocyanins and ellagitannins. Additionally, the anthocyanins, which are pigments that give red or purple colour to fruits, have been attributed benefits against coronary heart disease and certain types of cancer (Middleton et al., 2000). Considering these aspects, we can conclude that strawberries and blackberries function as a source of potentially healthy phytochemical compounds