

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

“Producción de ácido elálgico: Estudios enzimáticos”

TESIS
para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

PRESENTA
Antonio Francisco Aguilera Carbó

Director
Dr. Ernesto Favela Torres

México, D.F., Julio, 2009

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados de CONACYT y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo”.

La presente investigación fue financiada por el proyecto: “Identificación y participación catalítica de las enzimas fúngicas en la degradación de compuestos elagitaninos, con clave: SEP-CONACYT-2005-24348 (51360)

México D.F. a 28 de julio del 2009

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Producción de ácido elágico: Estudios enzimáticos”

que presentó
Antonio Francisco Aguilera Carbó

Comité Tutorial

Director: Dr. Ernesto Favela Torres
Co-director: Dr. Cristóbal Noé Aguilar González
Asesora: Dra. Lilia Arely Prado Barragán

JURADO

Dra. Lilia Arely Prado Barragán.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Dra. Diana Jasso Cantú.
Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”

Dra. Erika Salas Muñoz.
Universidad Autónoma de Chihuahua

Dr. Raúl Rodríguez Herrera.
Universidad Autónoma de Coahuila



Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento recibido para los estudios de posgrado a través de la beca otorgada con el numero de registro 188214.

A la **Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAMI)**, y de manera especial a los investigadores que hacen posible el posgrado en biotecnología.

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN)**, por facilitarme el permiso para la realización de estudios doctorales.

A la **Universidad Autónoma de Coahuila (UAdeC)** por recibirme durante la estancia de investigación.

Mi admiración, respeto y gratitud a los doctores **Ernesto Favela Torres, Cristóbal Noe Aguilar González, Arely Prado Barragán y Christopher Augur**, por su dirección y asesoramiento en todo momento, por su sabia paciencia para con mi persona (sobre todo eso). Por formarme como investigador permitiéndome mantener mi personalidad y ritmo de trabajo.

A los compañeros de la PP4, por hacer mi estadía en el DF, una gran experiencia amena y agradable, gracias amigos. Arturo, Isaías, Tom, Luz, Toño, Oswaldo, Marychu, Blanquita, Sra. Mary y todos los demás.

A los compañeros de habitación, Eduardo, Yaz, Abril y Raquel Romero sobre todo a ti por tu gran apoyo en mi estancia en el D.F.

A los compañeros del Departamento de Investigación en Alimentos de la UAdeC, por todo su apoyo durante mi larga estancia en sus laboratorios. Dr. Raúl, Dr. JC Contreras- Esquivel, Simón, Carlitos, Diego, Marco, Arturo, Ascacio, Marcela, Miguel, Armando, Mario, Ruth y los demás.

Un Agradecimiento especial a la Sra. Micaela González y toda la familia González por su apoyo incondicional. Gracias familia. Mica, Cristóbal, Miguel, Cristian, Omar, Ivannoe.

Dedicatoria

*A mi madre:
Julieta Elena Carbó Jiménez*

*A la familia:
Mica, Cristóbal, Miguel, Cristian, Omar, Ivannoe.*

A la memoria de mi padre

A mi hermana y familia: Claudia, Carlos, Karla y Carlos Jr.

A mis sobrinas: Mariana y Abigail

*A la familia Aguilera:
Maricruz, Mario, Enrique, Juany, Tere, Marcia, Mario jr y sus familias.*

A mi grandes amigos Gustavo Arauz Garza y Alberto Esquivel

A mis amigos, todos.

Glosario de abreviaturas y símbolos.

CMS:	Cultivo en medio sólido
ETP:	Elagitaninos totales de <i>Púnica</i>
gL ⁻¹	Gramos por litro
mgL ⁻¹	Miligramos por litro
µgmL ⁻¹	Microgramos por mililitro
L	Litros
mL	Mililitros
G	Gramos
Mg	Miligramos
µg	microgramos
gKg ⁻¹	Gramos por kilogramo
%	Porcentaje
Rpm	Revoluciones por minuto
Hz	Hertz
H	Horas
T	Tiempo
°C	Grados centígrados
pH	Potencial de hidrógeno
mgg ⁻¹	Miligramos por gramo de muestra
µgg ⁻¹	Microgramos por gramo de muestra
espmL ⁻¹	Esporas por mililitro
Rpm	Revoluciones por minuto
mmh ⁻¹	Milímetros por hora
vv ⁻¹	Volumen / volumen
mv ⁻¹	Masa / volumen
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
FT-IR	Equipo de Infrarojo con transformadas de Fourier
IAA	Índice de absorción de agua
PG	<i>Punica granatum</i>
AE	Ácido elágico
PSH	Cepa de <i>Aspergillus niger</i> PSH
GH-1	Cepa de <i>Aspergillus niger</i> GH-1
FTL	Fenoles totales de <i>Larrea</i>
LT	<i>Larrea tridentata</i>
mgXg ⁻¹	Miligramos de biomasa por gramo de soporte
a _w	Actividad de agua
UL ⁻¹	Unidades enzimáticas por litro

Contenido

<i>Glosario de abreviaturas y símbolos.</i>	vi
<i>Contenido de figuras.</i>	x
<i>Contenido de tablas.</i>	xi
<i>Resumen</i>	xii
<i>Abstract</i>	xvi
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	3
2.1 Generalidades de taninos.	3
2.2 Función de los taninos.	4
2.3 Taninos condensados.	5
2.4 Taninos hidrolizables.	5
2.5 Elagitaninos y ácido elágico.	6
2.5.1 Biosíntesis de elagitaninos.	6
2.5.2 Tipos de elagitaninos.	7
2.5.3 Elagitaninos monoméricos.	7
2.5.4 Elagitaninos oligoméricos y poliméricos.	9
2.5.5 Fuentes de elagitaninos.	10
2.5.6 Aplicaciones del ácido elágico y de los elagitaninos.	12
2.5.7 Biodegradación de elagitaninos.	13
2.6 Fuentes potenciales de elagitaninos.	17
2.6.1 Gobernadora (<i>Larrea tridentata</i>).	17
2.6.2 Hojasén (<i>Flourensia cernua</i> D. C).	18
2.6.3 Candelilla (<i>Euphorbia antisiphilitica</i>).	20
2.6.4 Sangre de drago (<i>Jatropha dioica</i>).	22
2.6.5 Granada (<i>Punica granatum</i>).	23
3. Justificación.	2
5	
4. Objetivos.	2
7	
4.1. Objetivo general.	27
4.2. Objetivos particulares.	27
5. Metodología Experimental.	2
8	
5.1 Obtención del material vegetal, reducción del tamaño de partícula y cuantificación de elagitaninos.	28
5.1.1 Material vegetal.	28
5.1.1.1 Gobernadora.	29
5.1.1.2 Hojasén.	29
5.1.1.3 Candelilla.	29
5.1.1.4 Sangre de drago.	29
5.1.1.5 Cáscara de granada.	29
5.1.1.6 Deshidratación de las muestras vegetales.	29
5.1.1.7 Molienda del material vegetal.	30
5.1.2 Cuantificación de elagitaninos.	30

5.1.2.1	Cuantificación espectrofotométrica de ácido elágico.	30
5.1.2.2	Cuantificación Cromatográfica (HPLC) de ácido elágico.	31
5.1.3	Caracterización físico-química del material seleccionado.	31
5.1.3.1	Determinación de materia seca total.	31
5.1.3.2	Determinación de humedad.	32
5.1.3.3	Determinación de cenizas.	32
5.1.3.4	Determinación de extracto etéreo.	32
5.1.3.5	Determinación de proteína cruda.	32
5.1.3.6	Determinación de fibra cruda.	33
5.1.3.7	Determinación del pH.	33
5.1.3.8	Determinación de azúcares totales y reductores.	33
5.1.3.9	Determinación de fenoles hidrolizables totales.	34
5.1.3.10	Determinación de pectina.	34
5.2	<i>Selección de cepas.</i>	35
5.2.1	Microorganismos.	34
5.2.2	Propagación de los microorganismos.	35
5.2.3	Determinación preliminar de crecimiento en microcosmos.	35
5.2.4	Evaluación de la velocidad de crecimiento de las cepas.	35
5.3	<i>Producción de ácido elágico por Aspergillus niger GH1 en cultivo en medio sólido.</i>	36
5.3.1	Uso de polvo de cáscara de granada como soporte y fuente de nutrientes.	37
5.3.2	Uso de extracto de cáscara de granada como fuente de carbono y energía y espuma de poliuretano como soporte sólido.	40
5.3.3	Determinación de proteínas.	41
5.3.4	Evaluación preliminar de la actividad elagitanasa.	41
5.3.5	Purificación de la elagitanasa.	43
5.4	<i>Producción a mayor escala de la enzima elagitanasa por cultivo en medio sólido y su purificación.</i>	45
5.4.1	Condiciones de cultivo.	45
5.4.2	Obtención del extracto enzimático.	45
5.4.3	Purificación del extracto enzimático.	46
5.5	<i>Caracterización físico-química de la enzima elagitanasa.</i>	46
5.5.1	Pruebas sobre la actividad enzimática bajo diferentes condiciones de reacción.	46
	6. Resultados.	4
	8	
6.1	<i>Cauntificación de elagitaninos, obtención del material vegetal y reducción del tamaño de partícula.</i>	48
6.1.1	Cuantificación de ácido elágico de los materiales vegetales.	48
6.1.2	Procesamiento del material vegetal seleccionado.	49
6.1.2.1	Procesamiento de cáscara de granada.	49
6.1.2.2	Caracterización físico química de la cáscara de granada.	50
6.1.2.3.	Perfil de polifenoles de cáscara de granada.	51
6.2	<i>Evaluación de cáscara de granada como sustrato para el crecimiento de hongos en CMS.</i>	52
6.2.1	Estudio de crecimeinto en microcosmos.	52
6.2.2	Estudio de crecimiento en placa.	53
6.2.2.1	Velocidad de crecimiento de las cepas GH1 y PSH sobre diferentes sustratos.	54
6.3	<i>Producción de ácido elágico y enzima elagitanasa por cultivo en medio sólido.</i>	55
6.3.1	Producción de ácido elagico por cultivo en medio sólido.	55
6.3.2	Cinética de producción del extracto enzimático con actividad elagitanasa y producción de ácido elagico por <i>A. niger</i> GH1 usando espuma de poliuretano	

como soporte.	62
6.3.3 Obtención de la fracción con actividad enzimática elagitanasa.	65
6.4 Desarrollo de la metodología para la evaluación de la actividad elagitanasa.	68
6.5 Caracterización físico-química de la enzima elagitanasa.	71
7. Conclusiones.	7
6	
7.1. Conclusión general.	76
7.2 Conclusiones particulares.	76
8. Contribuciones científicas.	7
7	
9. Perspectivas.	7
8	
10. Referencias Bibliografías.	7
9	
11. Apéndices.	8
9	
Anexo A.	90
Anexo B.	102
Anexo C.	108

Contenido de figuras

Figura	Titulo	Página
1	Clasificación y estructura general de los taninos.	4
2	Esquema de la oxidación de la pentagaloil glucosa.	7
3	Ruta biosintética de la formación de elagitaninos en hojas de roble.	8
4	Estructuras de elagitaninos.	9
5	Esquema de la biodegradación de elagitaninos.	16
6	Imágenes del crecimiento en microcosmos de las cepas de <i>A. niger</i> GH1.	53
7	Crecimiento de <i>A. niger</i> PSH en diferentes fuentes de carbono.	54
8	Crecimiento de <i>A. niger</i> GH1 en diferentes fuentes de carbono.	54
9	Fotografías de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> GH1 sobre cáscara de granada en polvo.	56
10	Curva de crecimiento de <i>Aspergillus niger</i> GH1 sobre cáscara de granada en polvo.	56
11	Curva cinética de pH y actividad de agua en CMS sobre cáscara de granada en polvo por <i>A. niger</i> GH1.	57
12	Cinética de consumo de azúcares totales en la fermentación por <i>Aspergillus niger</i> GH1 sobre cáscara de granada en polvo.	58
13	Cinética de consumo de elagitaninos en la fermentación por <i>Aspergillus niger</i> GH1 sobre cáscara de granada en polvo.	59
14	Curva cinética de producción de tanasa en la fermentación por <i>Aspergillus niger</i> GH1 sobre cáscara de granada en polvo.	60
15	Cinética de acumulación de ácido elágico en la fermentación por <i>Aspergillus niger</i> GH1 sobre cáscara de granada en polvo.	61
16	Cromatograma de la acumulación de ácido elágico de CMS.	61
17	Consumo de azúcares del extracto de cáscara de granada en CMS.	62
18	Cinética de producción de biomasa en CMS por <i>Aspergillus niger</i> GH1 empleando extracto de cáscara de granada en polvo.	63
19	Consumo de polifenoles totales del extracto de cáscara de granada en CMS.	64
20	Producción de ácido elágico por gramo de cáscara de granada.	64
21	Actividad enzimática elagitanasa en CMS.	65
22	Actividad enzimática elagitanasa de las fracciones obtenidas en la columna G-25 de exclusión molecular.	66
23	Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la columna QXL. (---); (barras en gris) la actividad enzimática de las fracciones	67
24	Geles de poliacrilamida SDS de las fracciones de obtenidas en FPLC.	67
25	Efecto de la concentración de ácido clorhídrico sobre el sustrato empleado para determinar la actividad elagitanasa.	68
26	Efecto de la concentración inicial de elagitaninos sobre la actividad elagitanasa.	69
27	Actividad enzimática de punto máximo evaluado a diferentes concentraciones de sustrato.	70
28	Evaluación de la actividad elagitanasa en función del tiempo.	71
29	Actividad enzimática bajo diferentes valores de pH.	72
30	Actividad enzimática evaluada a diferentes temperaturas.	73
31	Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas en las etapas de purificación.	75

Contenido de tablas

Tabla	Titulo	página
1	Elagitaninos y sus fuentes.	11
2	Plantas ricas en elagitaninos de importancia económica usadas como alimentos.	12
3	Aplicaciones fisiológicas de los elagitaninos y del ácido elágico.	13
4	Caracterización fisicoquímica de la gobernadora.	18
5	Composición botánica de la gobernadora en base seca.	18
6	Caracterización fisicoquímica del hojaseñ.	19
7	Caracterización fisicoquímica de la candelilla.	21
8	Caracterización fisicoquímica de sangre de drago.	22
9	Caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada.	24
10	Composición de los medios Pontecorvo para <i>Aspergillus</i> (ATCC).	36
11	Condiciones preliminares de la actividad elagitanasa.	42
12	Condiciones de operación para la columna G-25.	43
13	Condiciones de operación para la columna QXL.	43
14	Composición del gel de poliacrilamida de concentración 4x.	44
15	Composición del gel de poliacrilamida de resolución 4x.	44
16	Tinción de plata.	45
17	Contenido de ácido elágico en diferentes fuentes vegetales.	49
18	Rendimiento del procesamiento de frutos de granada.	50
19	Caracterización físico-química de cáscara de granada.	50
20	Composición de polifenoles en la cáscara de granada.	51
21	Velocidades de crecimiento de <i>A. niger</i> GH1 y PSH.	55
22	Parámetros cinéticos máximos alcanzados en el proceso fermentativo.	62
23	Comparativo de las condiciones del ensayo enzimático original, las modificaciones realizadas y las mejores condiciones encontradas.	73
24	Purificación de la enzima elagitanasa.	75

Resumen

La presente investigación es un esfuerzo para producir, purificar y caracterizar la enzima responsable de la degradación de elagitaninos, la selección de microorganismos capaces de degradar elagitaninos y la búsqueda de fuentes potenciales de elagitaninos y ácido elágico,

Los elagitaninos son una subdivisión de los taninos hidrolizables, su característica principal es el grupo hexahidroxidifénico (HHDP), que al ser liberado, sufre una lactonización espontánea, que consiste de un reacomodo de la molécula pasando a una estructura más estable, conocida como ácido elágico.

De manera natural el ácido elágico y los elagitaninos tiene la función de defensa en la planta al igual que otros taninos, contra ataques de virus, bacterias, hongos, insectos y rumiantes. Sin embargo, debido a la actividad biológica que presentan los han puesto en el centro de investigaciones con respecto aun gran número de enfermedades crónicas que pueden ser prevenidas o disminuir sus efectos, tales como, diferentes tipos de cáncer, disminución del colesterol en sangre, facilitador del transporte de glucosa, inhibidor de algunos virus como el del papiloma humano y síndrome de inmuno deficiencia, además de las aplicaciones clásicas, sobre la inhibición de microorganismos patógenos, hongos cutáneos y parásitos.

Existen un gran acervo de literatura sobre la biodregradación de galotaninos para producir ácido gálico, estos bioprocesos incluyen el uso de cultivos microbianos que inducen la biosíntesis de la tanin acil hidrolasa (EC 3.1.1.20) generalmente referida como tanasa, es una esterasa que hidroliza los enlaces éster presentes en los taninos. En el caso particular de los de los elagitaninos, la información es escasa y confusa, principalmente por la complejidad química y la diversidad de los elagitaninos.

El estudio de la degradación de elagitaninos por métodos biológicos (enzimáticos o microbianos) se esta convirtiendo en un tema fascinante y prometedor. Trabajos publicados sobre este tema se han centrado en la producción de ácido elágico, suponiendo la participación ciertas enzimas involucras en el proceso.

Sin embargo, se sabe que la hidrólisis selectiva de grupos galóilos de taninos complejos con la enzima tanasa produce elagitaninos.

En cuanto a la ruta de degradación de elagitaninos, no está definida la enzima responsable de la hidrólisis del grupo HHDP y hace falta información al respecto, también otro aspecto importante sobre esta ruta son las condiciones de lactonización del grupo HHDP a ácido elágico. Hasta el momento los dos no se han descrito claramente. El resto de la ruta de biodegradación ha sido estudiado y descrito.

Se ha reportado (2003) la producción de ácido elágico fermentando pomaza de arándanos en cultivo en medio sólido, atribuyendo la catálisis a la enzima β -glucosidasa, más tarde en 2005 presentan una enzima llamada valonea tanino hidrolasa.

En una primera etapa se evaluaron de forma tradicional (hidrólisis con HCl-Metanol a temperaturas altas) diferentes fuentes vegetales, para determinar la concentración de elagitaninos, los resultados obtenidos en mg g^{-1} en base seca fueron los siguientes, para cáscara de granada en estado de maduración intermedia y estado maduro (33.79 ± 7.43 y 12.80 ± 5.83), Candelilla (2.18 ± 0.39), Gobernadora (2.5 ± 0.72), Hojasén (1.59 ± 0.96) y Sangre de drago (0.81 ± 0.43).

La cáscara de granada fue el material vegetal con mayor concentración de elagitaninos, por la que se procedió a la realización de un análisis físico-químico y perfil de taninos. En cuanto al perfil de polifenoles se obtuvo que cuenta con 9.3% de los mismos, de los cuales 3.4% son taninos condensados y 5.4% corresponden a taninos hidrolizables, que a su vez los taninos hidrolizables corresponden a 0.6% de galotaninos y 5.3% a elagitaninos.

Caracterizado el material vegetal se evaluó la capacidad de hongos filamentosos para emplear los elagitaninos como fuente de carbono y energía en un sistema de microcosmos y finalmente por crecimiento en placa. En los dos experimentos las cepas de *Aspergillus niger* GH1 y PSH, crecieron sobre las fuentes con elagitaninos. Los resultados del crecimiento en placa mostraron que *A. niger* GH1 y PSH crecen a una velocidad de $0.551 \pm 0.1122 \text{ mm h}^{-1}$ y $0.634 \pm 0.0424 \text{ mm h}^{-1}$

respectivamente. Ambas cepas presentaron dificultad para crecer sobre el medio con ácido elágico, $0.087 \pm 0.1603 \text{ mmh}^{-1}$ y $0.050 \pm 0.0080 \text{ mmh}^{-1}$ respectivamente. Se eligió la cepa de *Aspergillus niger* GH1, debido su ligera tolerancia al producto de la hidrólisis de elagitaninos. Sin embargo aun quedan dudas sobre este comportamiento, lo cual puede ser debido a la baja solubilidad del ácido elágico.

Seleccionado el material vegetal y la cepa de *Aspergillus niger* GH1, se procedió a realizar la etapa para evaluar la producción de ácido elágico en cultivo en medio sólido (CMS), empleando la cáscara de granada como soporte y fuente de carbono y las sales del medio Czapek Dox mínimo, en cajas de Petri de 9 cm, por 144 h a temperatura de 30 °C. Los resultados obtenidos en esta etapa muestran que el pH se mantiene entre 4-5, la actividad de agua se mantuvo dentro del rango de tolerancia para *Aspergillus niger* (0.99-0.95), se consumió el 85 % de los azúcares a las 72 h de cultivo, Las fenoles totales se redujeron en un 20% a las 24 h, y se obtuvieron $12.39 \pm 4.0 \text{ mg}$ de AE/g de soporte a las 48 de cultivo.

Dentro de la misma etapa se empleó un sistema diferente para llevar a cabo la producción de la enzima elagitanasa por *A. niger* GH1 en CMS, usando extracto de cáscara de granada como fuente de carbono y energía, las sales del medio Czapek Dox y como soporte espuma de poliuretano (PUF), se prepararon reactores de 250 mL, con 3 g de PUF, 7 mL del medio de cultivo, se inocularon y se mantuvieron a 30° C en una cinética de 72 h. los resultados obtenidos fueron similares al experimento anterior en cuanto al consumo de los sustratos, La acumulación de ácido elágico fue 50% menor que usando el polvo de cáscara de granada. La actividad elagitanasa fue de $44.5 \pm 1.5 \text{ U/L}$ a las 48 h de cultivo.

El extracto obtenido a las 48 horas se dializó por membranas de celulosa de 12 kDa, usando solución amortiguadora de citratos 25mM, a pH 5 temperatura 2-4 °C, manteniéndose en refrigeración (4-8 °C) cambiando el líquido cada 8 horas hasta obtener un extracto transparente. Finalmente, se filtró por membrana de $0.45 \mu\text{m}$ y se sometió a cromatografía en un equipo FPLC, usando una columna G-25 para permeación en gel, en donde se obtuvieron 8 fracciones, teniendo actividad elagitanasa en la fracción 2, la cual fue fraccionada usando en una columna QXL de

intercambio iónico, donde se obtuvieron 40 fracciones, se determinó la actividad elagitanasa obteniéndose en las fracciones 34 y 39, se evidenció la presencia de 2 bandas en la fracción de G-25 y una de 200 kDa en la fracción 34 de QXL, se evidenciaron las bandas en un gel SDS-PAGE.

Obtenido el protocolo para la purificación se procedió a la producción de extracto enzimático, en un reactor de charolas de mayor capacidad, bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, se obtuvieron 1950 mL de extracto enzimático, el cual se dializó en membranas de celulosa de 12 kDa en solución amortiguadora de citratos 25 mM, el extracto dializado se filtró por membranas de 0.45 μ , El filtrado se ultrafiltró reteniendo el permeado, el cual fue separado por una columna de permeación en gel y finalmente por una columna de intercambio iónico QXL, se evidenciaron las bandas en un gel SDS-PAGE.

La enzima purificada fue parcialmente caracterizada en cuanto al efecto de la concentración de sustrato, pH y temperatura de reacción. Los resultados mostraron que a una concentración de 1 mgmL⁻¹ de elagitaninos, pH 5 y temperatura de 60 °C se obtienen las mejores condiciones de reacción de la enzima elagitanasa.

La presente investigación revela el potencial de especies del Desierto Chihuahuense como fuentes de elagitaninos, la capacidad de hongos filamentosos de producir la enzima elagitanasa, además se desarrolló un proceso biotecnológico para la producción de ácido elágico y de la enzima elagitanasa y el papel que desempeña esta en la biodegradación de elagitaninos y la producción de ácido elágico.

Abstract

The aim of this research is to produce, purify and characterize the enzyme responsible for the ellagitannins degradation.

Ellagitanins are a hydrolysable tannins, its main feature is the group hexahydroxydiphenyl (HHDP), that when is released a spontaneous lactonization occurs, which consists of a realignment of the molecule moving to a more stable structure, known as ellagic acid.i

Ellagic acid and ellagitannins play a defense roll in the plant against viruses, bacteria, fungi, insects and ruminants. They have an important biological activity like antioxidant, radical scavenging, astringent flavor, coupling with proteins (amino acids) and carbohydrates. This are positioned in the target of researches about on a number of chronic diseases can be prevented or reducing their effects, such as different types of cancer, cholesterol blood decreased, inhibition of some viruses like human papilloma and immune deficiency syndrome, in addition to conventional applications, on the inhibition of pathogenic microorganisms, fungi and skin parasites.

There is a large heritage literary on gallotannins biodregradación and gallic acid production, these include the use of bio-microbial cultures that induce biosynthesis of tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) generally referred to tannase. This enzyme is an esterase that hydrolyzes the ester linkages in tannins. In the particular case of ellagitanins, information is scarce and confusing, mainly due to the chemical complexity and diversity of ellagitanins.

Ellagitanins degradation studies by biological methods (enzymatic or microbial) are becoming a fascinating and promising topic. Published papers on this topic have focused on the production of ellagic acid, assuming the participation of certain enzymes involved in the process. However, it is known that selective hydrolysis of galoyl groups in tannins complex with tannase enzyme produces ellagitanins.

Regarding the degradation ellagitanins pathway, is not well defined the enzyme responsible for hydrolysis of the HHDP group, and research to clarify this is needed. Also another important aspect of this topic is the lactonization HHDP conditions for the ellagic acid molecule. So far these two aspects have not been described, and more research have to be done in order to know this aspects will be relevant. The rest of the pathway of biodegradation has been studied and described.

In a first part of this work, the extraction of ellagitanins from different sources using the traditional methodologies was addressed. The hydrolysis was carried out using HCl-methanol. The hydrolysis temperature was at 90 °C. The results obtained in mgg^{-1} on dry weight were as follows, to *Punica granatum* husk

ripened and intermediate ripened (12.80 ± 5.83 and 33.79 ± 7.43), *Euphorbia antisyphylitica* (2.18 ± 0.39), *Larrea tridentata* (2.5 ± 0.72), *Fluorensia cernua* (1.59 ± 0.96) and *Jatropha dioica* (0.81 ± 0.43).

Pomegranate husk was the plant material with the highest concentration of ellagitanins, which proceeded to physico-chemical analysis profile of tannins. The results showed a polyphenols content of 9.3% from total tannins, of which 3.4% are condensed tannins and 5.4% hydrolysable tannins, of which in turn correspond 0.6% to gallotannins and 5.3% to ellagitanins.

After material characterization, the second part of the work was to assess the ability of filamentous fungi to used ellagitanins as a carbon and energy source in controlled micro-system and also growth plate analysis was done. In both experiments the strains of *Aspergillus niger* GH1 and PSH were used. The results of the growth plate showed that *A. niger* GH1 and PSH grow at a rate of 0.551 ± 0.1122 mmh⁻¹ and 0.634 ± 0.0424 mmh⁻¹, respectively. Both strains presented difficulty to grow on the medium with ellagic acid, 0.087 ± 0.1603 mmh⁻¹ and 0.050 ± 0.0080 mmh⁻¹ respectively. The selected strain of *Aspergillus niger* GH1 was selected to further studies because his slight tolerance to the product of hydrolysis ellagitanins. However, some questions still remain about this behavior, which may be due to the low solubility of ellagic acid.

Selected *Punica granatum* plant material and the strain of *Aspergillus niger* GH1, was carried out to assess the stage production of ellagic acid in solid state culture (SSC) using the Pomegranate husk as carbon source and salts of Czapek Dox culture in Petri dishes of 9 cm, time 96 h, temperature 30 °C. The results showed that the pH is kept between 4-5, the water activity was within the range of tolerance for *Aspergillus niger* (0.99-0.95), consumed 85% of sugars at 72 h cultivation, the total phenol were reduced by 20% at 24 h, and the production of ellagic acid was 12.39 ± 4.0 mg AE/g support for the 48h.

Also, in this part of the work, a different system to carry out the production of the ellagitanase enzyme by *A. niger* GH1 in SSC using pomegranate husk extract as carbon and energy source, the salts of Czapek Dox medium and solid support was polyurethane foam (PUF), were prepared from 250 mL reactor an added to 3 g of PUF, 7 mL of culture medium, were inoculated and maintained at 30 °C for a period of time of 72 h. The results were similar to the previous experiment in the consumption of substrates, however the accumulation of ellagic acid was 50% lower than using the pomegranate husk like a support. Ellagitanase activity was 44.5 ± 1.5 U/L at 48 h of culture.

The extract obtained at 48 hours was filtered using cellulose dialysis membrane of 12 kDa, using citrate buffer of pH 5 to 25 mM temperature 2-4 °C, maintained under refrigeration (4-8 °C) by changing the fluid every 8 hours to obtain a clear membrane extract was subjected to FPLC. Finally, filter through 0.45µm chromatography using a G-25 column for gel permeation, which was obtained 8 fractions, taking ellagitanase activity in the fraction 2, which was fractionated using QXL on an ion exchange column, where 40 fractions were obtained, the activity ellagitanase obtaining fractions 34 and 39, demonstrate the presence of 2 bands in the

fraction of G-25 and 200 kDa in only one in fraction 34 and 39 of QXL, the bands were found in an SDS-PAGE gel.

Finally, once the purification protocol was developed, experiments were carried out to scale up the production of the enzyme tannase using a tray bioreactor. The enzyme extract obtained was 1950 mL and this was dialysed on cellulose membranes at 12 kDa with citrate buffer solution (25 mM), before filtered by 0.45 μ membranes, The extract obtained was ultrafiltered and the retained fraction collected, which was separated by a gel permeation column G-25 and finally by QXL a ion exchange column, where the fractions showed a band in SDS-PAGE gel to 200 kDa.

The enzyme partially purified was characterized as to concentration substrate effect, pH and reaction temperature. Results showed that ellagitannins concentration of 1 mg mL⁻¹, pH 5 and 60 °C gives the best ellagitanase reaction conditions.

This research showed the potential of the Chihuahuan Desert species as ellagitannins sources. Also the development of a bioprocess for the production of ellagitanase enzyme using microorganism isolated from Chihuahua desert was presented.



1. Introducción

Las investigaciones orientadas hacia la recuperación de compuestos polifenólicos, en particular de los elagitaninos y sus derivados, se han incrementado desde la última década, sobre todo por la importancia que éstos han alcanzado entre la población humana; en particular, la expectativa de prolongar la vida promedio al reducir y prevenir un buen número de enfermedades que se asocian con los malos hábitos alimenticios.

El uso de compuestos bioactivos de tipo polifenólico se ha popularizado debido al efecto antioxidante y nutraceutico de los mismos, ya que su actividad biológica puede prevenir enfermedades como son: el cáncer en sus diferentes modalidades, los problemas asociados con afecciones cardiacas, hipertensión arterial, niveles altos de colesterol en sangre, entre otras. Así mismo, se ha demostrado que dichos compuestos participan en la inhibición de bacterias, parásitos y virus; este último tópico, ha promovido el inicio de una serie de estudios a nivel mundial por el potencial que representan los compuestos polifenólicos bioactivos como una alternativa para lograr la inhibición de enfermedades virales crónicas como la inmunodeficiencia adquirida (VIH) y el papiloma humano (VPH).

Los compuestos bioactivos de tipo polifenólico, particularmente los elagitaninos y el ácido elálgico han encontrado también gran aplicación en la industria de cosméticos para la fabricación de cremas aclaradoras de piel y en la industria de alimentos para la elaboración de alimentos nutraceuticos. Sin embargo, uno de los mayores problemas asociados a los procesos de extracción de este tipo de compuestos bioactivos o fitomoléculas implica la utilización de procesos químicos tradicionales que emplean ácidos fuertes, grandes cantidades de solventes, condiciones de proceso extremas, equipo sofisticado, obtención de productos contaminados y bajos rendimientos. Por tal motivo resulta necesario el desarrollo de bioprocesos y metodologías dirigidas al mejoramiento del proceso de extracción. Los bioprocesos microbianos y enzimáticos representan atractivas ventajas que pueden mejorar y facilitar el proceso de obtención de los compuestos bioactivos

polifenólicos, incrementando los rendimientos y la calidad de las fitomoléculas obtenidas.

Con el fin de ofrecer una alternativa biotecnológica para la obtención de ácido elágico, en la presente investigación, el objetivo general fue extraer y cuantificar el ácido elágico de diferentes materiales vegetales, se seleccionó el que presentó mayor concentración de ácido elágico y utilizar este material como sustrato para estudios de cultivo en estado sólido para producir enzimas necesarias para la extracción de ácido elágico. En particular, los objetivos fueron: estudiar la biodegradación de los elagitaninos presentes en la cáscara de granada e identificar de la enzima que participa en dicho proceso permitiendo la liberación del potente antioxidante, ácido elágico.

Como parte de los antecedentes de este trabajo se hace una revisión de la literatura en aspectos relacionados con los taninos, enfocándose principalmente a los elagitaninos, en cuanto a sus fuentes, biosíntesis, biodegradación y aplicaciones. A continuación se presenta la justificación de esta investigación. Posteriormente, se describe la metodología experimental empleada, desde la recolección del material vegetal hasta la purificación parcial de la elagitanasa. En el capítulo cinco se presentan los resultados y discusión de los mismos. Enseguida, se presentan las conclusiones, con las que se evidencia el aporte generado durante la investigación, sobre la producción y purificación parcial de la enzima elagitanasa. Para finalizar, se incluyen algunas sugerencias para futuros trabajos de investigación relacionados con el tema, el último capítulo enlista la literatura citada en el documento.



2. Antecedentes

2.1 Generalidades de taninos

Los taninos son compuestos ampliamente distribuidos en el reino vegetal, se encuentran en raíces, tallos, corteza, tronco, hojas, flores, frutos y semillas. Estos compuestos tienen la función natural de proteger a las plantas debido a su capacidad de formar complejos con proteínas y otros compuestos (Haslam, 1989).

El término tanino se ha usado en forma indiscriminada por diferentes autores, sin embargo, en 1997, Lekha y Lonsane, criticaron la palabra usada por Haslam y Strangoon en 1966, para referirse al ácido tánico como “taninos”. Ellos sugirieron la necesidad de implementar una terminología asociada a una correcta clasificación de los compuestos fenólicos en cuestión.

Los taninos son polifenoles presentes en la naturaleza, solubles en agua, de peso molecular variable, de 500 a 3000 Da, dependiendo de los enlaces establecidos con proteínas y polisacáridos como celulosa y pectina (Swain y Bate-Smith, 1962, Khanbabaee y Ree, 2001), Su principal característica es la de formar complejos precipitables con proteínas (Spencer *et al.*, 1988). Sin embargo, los compuestos polifenólicos polimerizados tales como, taninos condensados y elagitaninos pueden llegar a tener pesos moleculares de hasta 40000 Da (Khanbabaee y Ree, 2001).

Muchos de los alimentos de origen vegetal contienen taninos, en el caso de los cereales como el sorgo, estos compuestos afectan el color, apariencia y valor nutritivo del grano y de sus productos. Las infusiones de plantas como el té verde, té negro u otras menos usuales o de empleo regional, también los contienen. Sin embargo, en el caso de las frutas de bayas les confieren una apariencia agradable y atractiva para su consumo, como es el caso de las fresas, zarzamoras, moras, cerezas, arándanos y otros más.

Los taninos son metabolitos secundarios de las plantas (Bath *et al.*, 1998). De acuerdo a su estructura los taninos pueden dividirse en cuatro grupos: galotaninos, elagitaninos, taninos condensados y taninos complejos (Khanbabaee y Ree, 2001)

(Figura 1). Lekha y Lonsane (1997) reportaron que los taninos condensados son polímeros de flavan-3-ol o de flavan-3,4-diol, que de acuerdo con Godwin y Mercer (1983) no contienen residuos de azúcares. Además, George y Sen (1960) demostraron que la tanasa actúa únicamente sobre los taninos hidrolizables.

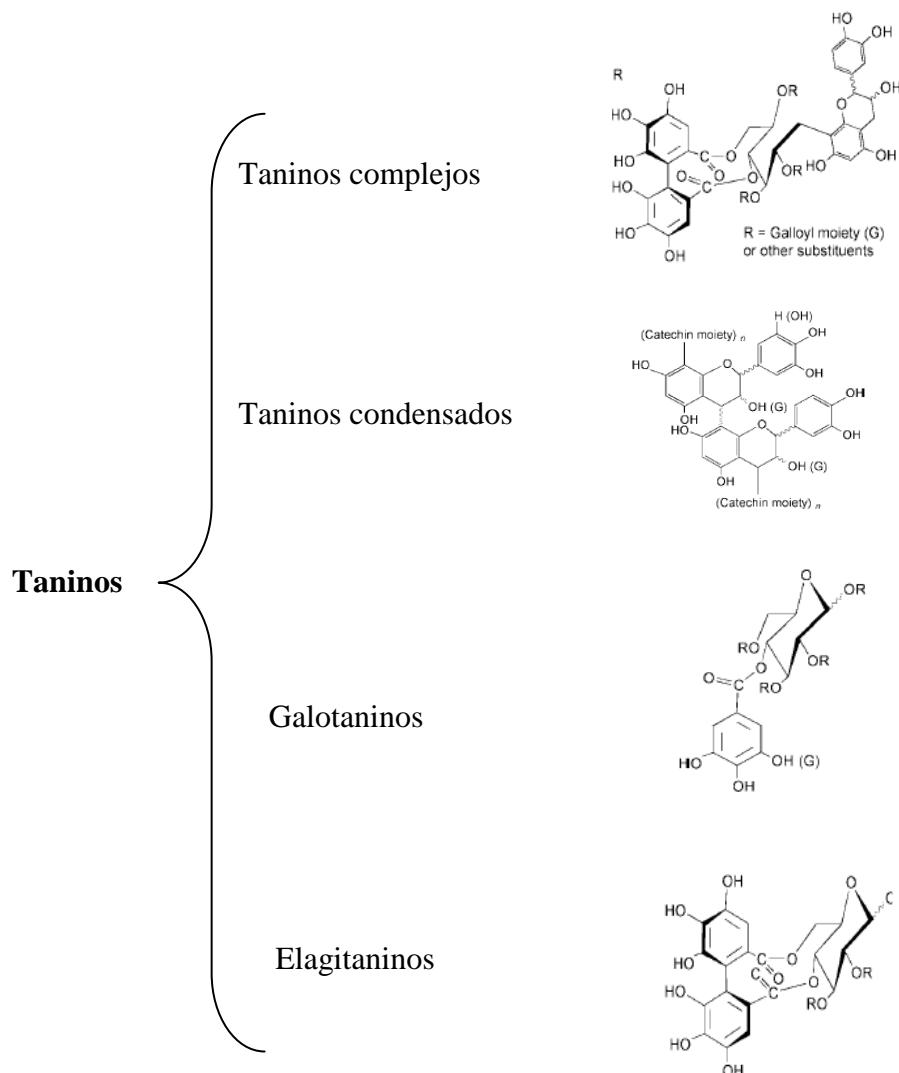


Figura 1. Clasificación y estructura general de los taninos (Khanbabaee y Ree, 2001).

2.2 Función de los taninos en las plantas

Los taninos se encuentran dentro de las vacuolas de las células de plantas intactas. Algunas plantas los acumulan en hojas, corteza y tronco; esta acumulación protege las partes vulnerables de la planta contra el ataque de virus y la inactivación de enzimas extracelulares de microorganismos. Su interacción con proteínas de la membrana impide la infección de algunos tejidos (Field y Lettinga, 1992a; Silva *et al.*, 1997), Además, los taninos son una defensa contra el ataque de insectos (Goldstein y Swain, 1995). También ofrecen protección contra rumiantes debido al complejo que forman los taninos con las proteínas de la lengua y con las proteínas de

la saliva ricas en hidroxiprolina, dando una sensación astringente desagradable para los depredadores de las plantas (Edelmann y Lendl, 2002). Los sustratos susceptibles de ser utilizados por los microorganismos, como polisacáridos y proteínas no enzimáticas, al acomplejarse con los taninos presentes en las plantas se convierten en material no disponible para los microorganismos (Benoit *et al.*, 1968).

Los taninos inhiben el crecimiento de un gran número de microorganismos, se consideran como compuestos recalcitrantes a la biodegradación (Field y Lettinga, 1992a). Los taninos condensados son más resistentes al ataque microbiano que los hidrolizables y son tóxicos para una variedad de microorganismos. Por esta razón, los taninos generalmente retardan la velocidad de descomposición de la materia orgánica sólida por la vía de la inhibición de enzimas degradativas del organismo atacante (Scalbert, 1991). Aún con las propiedades antimicrobianas de los taninos, muchos hongos, bacterias y levaduras son resistentes y pueden crecer y desarrollarse sobre ellos.

2.3 Taninos condensados

Los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas poliméricas, están compuestos de unidades flavonoides y se encuentran en la corteza, tronco de árboles, flores y frutos. Las proantocianidinas están basadas en la estructura del flavan-3-ol como catequina, o una estructura flavan-3,4-diol como las leucoantocianidinas. Un tanino condensado típico puede ser representado por el dímero de proantocianidina, al cual se unen moléculas de flavan. Los taninos de alto peso molecular (unidades poliméricas) nunca han sido aislados en estado puro. Estos oligómeros y polímeros de unidades de flavonoides, ligadas por enlaces C-C, no son susceptibles a la formación de enlaces después de su hidrólisis (Garro *et al.*, 1997).

2.4 Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables están compuestos de moléculas de ácido gálico (galotaninos) o ácido elágico (elagitaninos) esterificados con un azúcar esencial que generalmente es glucosa. Estos taninos son hidrolizados con ácidos, bases o enzimáticamente, dando productos monoméricos (Huang *et al.*, 2005). En cuanto a los galotaninos, la fuente más conocida es el ácido tánico de origen vegetal, el cual consta de una molécula central de D-glucosa y 5 unidades de galoilos ligados a los hidroxilos del glucósido (Sánchez-Alvarado, 2001). Por otra parte, los elagitaninos

están formados por ácido hexahidroxidifénico (HHDP), el cual al ser hidrolizado se deshidrata espontáneamente (lactonización) para formar el ácido elálgico.

2.5 Elagitaninos y ácido elálgico

Los elagitaninos pertenecen a una subdivisión de taninos hidrolizables, son derivados del metabolismo secundario de las angiospermas; generalmente de las dicotiledóneas (Quideau y Feldman, 1996). En algún momento fueron consideradas como moléculas indicadoras de la evolución de las dicotiledóneas (Sporne, 1975); que por cierto, no se les ha dado la relevancia que merecen.

Desde el siglo antepasado existen reportes científicos relacionados con el ácido elálgico. En 1809, Berthollet aisló ácido elálgico de excremento de cabras persas. Poco tiempo después, Merklin y Woehler (1848) revelaron la presencia de este ácido en la vejiga de animales de pastoreo. Otros investigadores reportaron su presencia en materiales de curtiduría y lo llamaron ácido elagitánico (Nierenstein, 1915; Procter, 1893). En 1945, Nierenstein y Potter examinaron alrededor de 40 plantas diferentes provenientes de América, Asia, Europa y Oceanía, obteniendo como moléculas que contenían fracciones de glucosa y de ácido elálgico, correspondientes a los elagitaninos, que en aquel tiempo fueron denominándolos mirobolanitaninos.

En un estudio reportado por Damodaran *et al.* (1936) se indica que las primeras técnicas de análisis de ácido elálgico fueron desarrolladas por Procter en 1894. Dicho estudio describe que una solución diluida con pocos cristales de nitrito de potasio exhibió un cambio gradual de rosa a azul oscuro como reacción característica para identificar la presencia de elagitaninos. La elucidación de las estructuras moleculares de algunos elagitaninos se da después de los años cincuentas por Schmidt y Mayer (Quideau y Feldman, 1996) y hasta la fecha se siguen presentado nuevas estructuras de estos compuestos.

El conocimiento de las estructuras moleculares de los elagitaninos evidenció su vasta diversidad estructural y generó las bases sobre la química y bioquímica de los elagitaninos.

2.5.1 Biosíntesis de elagitaninos

La biogénesis de elagitaninos se genera a partir de la pentagaloil glucosa (PGG). La ruta biosintética fue elucidada por Gross y Niemetz (1992) y por Niemetz *et al.* (2001, 2003 y 2005). La oxidación de los grupos galoilos de PGG se lleva a

cabo vía enzimática por una polifenol oxidasa, que realiza el acoplamiento carbono-carbono en posición 6 de dos grupos galoilos para formar *in situ* el grupo hexahidroxidifenoil (HHDP). En la figura 2 se presenta el mecanismo de formación de un elagitanino a partir de un galotanino.

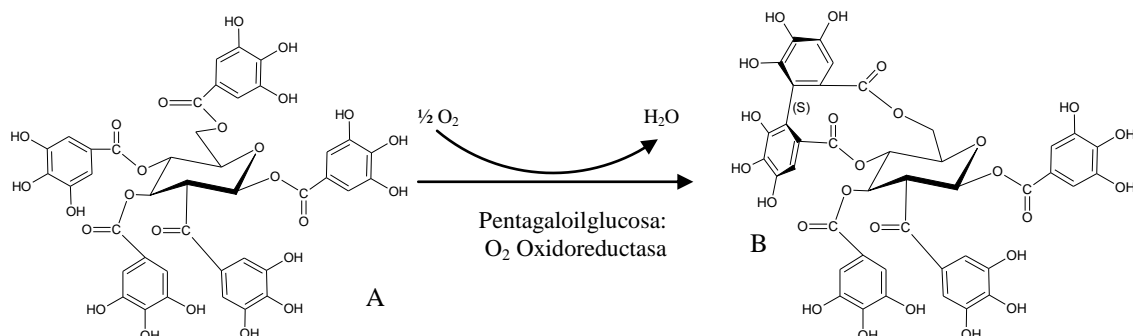


Figura 2. Esquema de la oxidación de la pentagaloiil glucosa (A), al elagitanino telimagrandina II (B) por la lacasa (3.10.3.2) del tipo fenol oxidasa.

Fuente: Niemetz *et al.*, 2003.

2.5.2 Tipos de elagitaninos

Los elagitaninos se clasifican de acuerdo al número de grupos HHDP que presenten en la molécula; pueden ser monoméricos, oligoméricos y poliméricos de acuerdo al peso molecular o largo de la molécula (grado de polimerización) (Quideau y Feldenman, 1996).

2.5.3 Elagitaninos monoméricos

Los elagitaninos monoméricos se refieren exclusivamente a los que tienen solo un grupo HHDP en la molécula de glucosa. El acoplamiento oxidativo C-C intramolecular entre galoilos forma el grupo HHDP, resultando en la transformación de PPG en un elagitanino monomérico (Haslam y Cai 1994). El más común y natural acoplamiento ocurre en los grupos galoil pares 4,6- (acoplamiento entre el grupo galoil en C4 y C6 de la molécula de glucosa) y en 2,3- (acoplamiento entre grupos galoil de C2 y C3 de la molécula de glucosa). Además, pueden acoplarse los grupos galoil en 1,6-, 1,3-, 3,6- y 2,4-. Estos diferentes pares de acoplamiento proveen de una complejidad estructural a los elagitaninos monoméricos; que es además complicada por las diferentes extensiones de galocilación, la estereoquímica de los grupos HHDP, la formación de glucósidos, así como por la estereoquímica anomérica de la molécula de glucosa (Haslam y Cai, 1994; Quideau y Feldman, 1996; Lei, 2002).

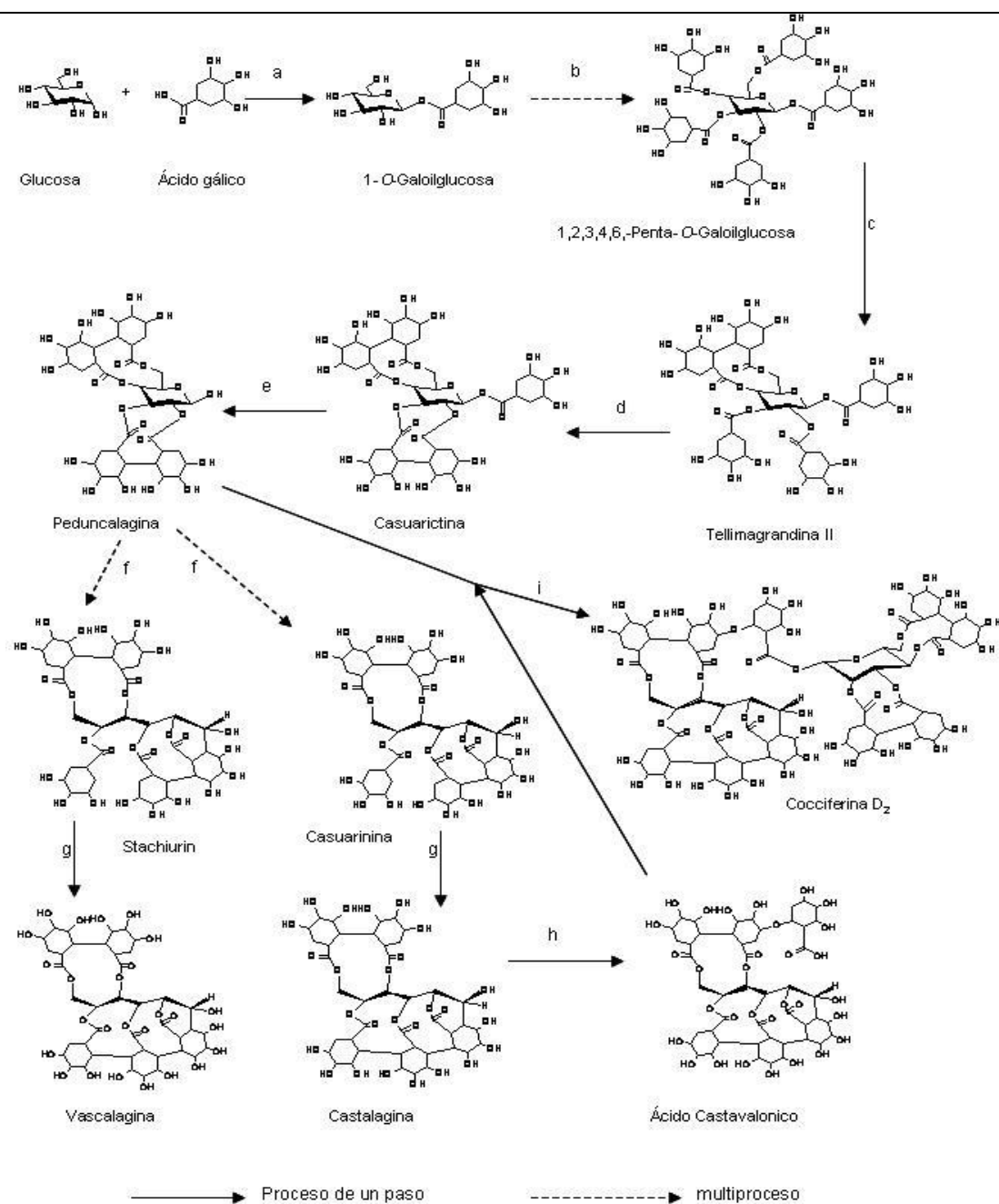


Figura 3. Ruta biosintética de la formación de elagitaninos en hojas de roble (*Quercus rubus* L.). (a) Galoilación en C-1 de la glucosa; (b) cuatro pasos seguidos de galoilación; (c) Acoplamiento oxidativo entre C-4 y C-6 de grupos galoilo para formar el grupo HHDP; (d) Acoplamiento oxidativo entre C-2 y C-3 de grupos galoilo para formar un segundo grupo HHDP; (e) Escisión del grupo galoilo en C-1; (f) Abertura del anillo de glucopiranososa en C-1 seguida de una galoilación en C-5; (g) Acoplamiento oxidativo en los anillos bencénicos en C-4 y C-5; (h) galoilación en C-4/C-5 para formar el grupo Valoneilo; (i) Dimerización de puduncalagina y ácido castavalónico para formar cocciferina D₂.

Fuente: Salminen *et al.*, 2004.

Los elagitaninos más comunes en las plantas son 4,6-HHDP, 2,3-HHDP libre o acoplados. Los representantes típicos de elagitaninos monoméricos contienen el acoplamiento en los grupos 4,6-HHDP y son tellimagrandina II, strictina y tellimagrandina I. Los elagitaninos con el acoplamiento en los grupos 2,3-HHDP se

ejemplifican por la pterocaryanina C, sanguina H5 y H4, otras subclases de elagitaninos monoméricos son los acoplamientos en los grupos 4,6- y 2,3 y se encuentran generalmente en maderas como casuarictina, potentillina y pedunculagina (Lei, 2002).

Otro grupo significativo de elagitaninos monoméricos formado por glicósidos acíclicos aromáticos está representado por vascalagina y castalagina, estos dos glucósidos aromáticos tiene acoplamientos 4,6-HHDP y un único grupo flavogaloil que está compuesto por tres grupos galoiilos acoplados entre sí, por enlaces C-C. Este elagitanino acíclico y sus polímeros son los principales elagitaninos reportados en la literatura (Quinn y Singleton, 1985; Viriot *et al.*, 1994).

En la figura 4 se muestran algunas estructuras de elagitaninos monoméricos como punicalagina (1), vascalagina (2), largestanina (3), castanopsiniina (5) y elagitaninos complejos como la heterophyllina (4).

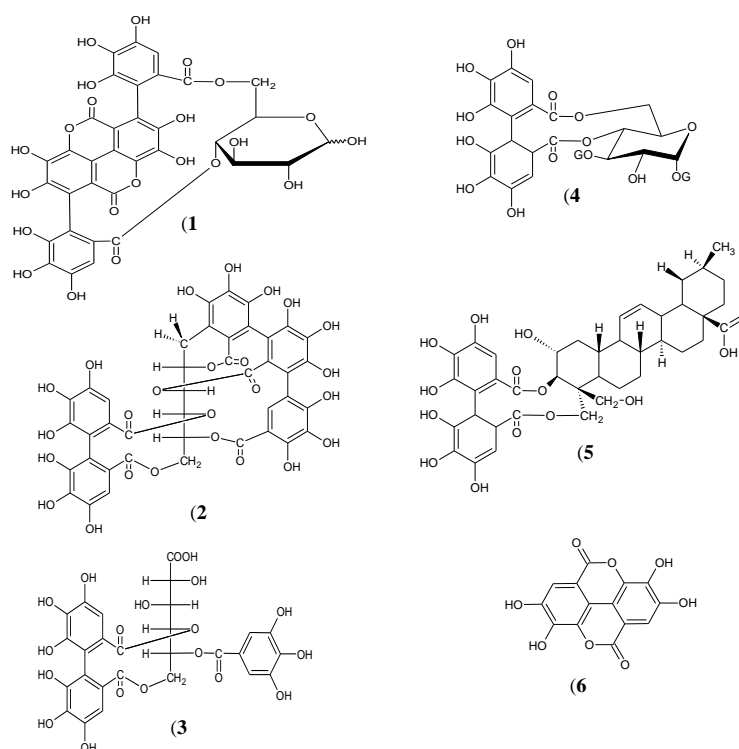


Figura 4. Estructuras de elagitaninos. Punicalina (1), vascalagina (2), largestanina (3), heterophyllina A (4), castanopsiniina A, (5) y ácido elágeno (6).

2.5.4 Elagitaninos oligoméricos y poliméricos

Los elagitaninos monoméricos pueden ser oligómeros o polímeros de elagitaninos (Haslam y Cai, 1994). Éstos se encuentran en las plantas junto con sus monómeros. Los elagitaninos oligoméricos son dímeros o tetrámeros de elagitaninos.

La polimerización de elagitaninos monoméricos principalmente es llevada a cabo por el acoplamiento oxidativo C-O entre grupos galoil y entre grupos galoil y HHDP, precursores apropiados de elagitaninos monoméricos (Zhang *et al.*, 2001; Haslam y Cai, 1994; Quideau y Feldman, 1996). La clave de los elagitaninos oligoméricos la representa el acoplamiento oxidativo C-O incluidos, tellimagradin I dímeros de coriariin (acoplamiento oxidativo C-O entre grupos galoil) y rugosina D (acoplamiento oxidativo entre grupos galoil y el grupo HHDP).

En el caso de los elagitaninos oligoméricos con un acoplamiento oxidativo C-C están representados por dímeros como vascalagina (2) y/o castalagina:roburin A y roburin D. Los elagitaninos monoméricos bajo el acoplamiento oxidativo C-C son típicamente glicósidos aromáticos acíclicos. Sin embargo, no es como prevalecen los acoplamientos C-O; los dímeros de éstos son derivados de glicósidos aromáticos acíclicos por en enlace C-C. (Quideau y Feldman, 1996; Quideau y Feldman, 1997; Lei, 2002; Zhang *et al.*, 2001).

2.5.5 Fuentes de elagitaninos

Existen más de 500 diferentes estructuras de elagitaninos reportadas (Feldman *et al.*, 1999). Los elagitaninos son obtenidos principalmente de la corteza y troncos de árboles como de roble (*Quersus* ssp.) de diferentes variedades, tales como, *alba Missouri*, *alba Virginia*, *garrayana*, *petrea*, *primus*, así como, de estas mismas pero de distintas regiones como Francia, Checoslovaquia y Norteamérica, (Lei *et al.*, 2001) como son: *Quersus robur* y *pertea* Liebl. (Doussot *et al.*, 2000). Los elagitaninos vascalagina y valonia son frecuentemente reportados para estas variedades de árboles (Lei *et al.*, 2001; Lei, 2002), la castalagina está presente en la castaña, *Castanea dentata*, (Lei *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2005). En la tabla 1 se presentan algunos de los elagitaninos reportados en la literatura.

Los elagitaninos y el ácido elálgico son consumidos por el hombre de manera común en frutas, semillas y en los alimentos o bebidas elaborados a partir de ellos, como jugos o zumos de frutas, mermeladas, etc. (Clifford y Scalbert, 2000).

Tabla 1. Elagitaninos y sus fuentes.

Elagitaninos	Fuente vegetal	Referencia
Vascalagina, castalagina, valonia, cocciferina D ₂ y ruburinas A-E.	<i>Quercus sp.</i>	Lei <i>et al.</i> , 2001; Salminen <i>et al.</i> , 2004; Huang <i>et al.</i> , 2005.
Nobotaninos A, B, F G, K, P, Q, R, S y T, brediatina B, β-glucogalina, pedunculagina; 4-6-(S)-HHDP-glucopiranos, malabathrina D, pterocaryanina C, (1,4,6-O-trigaloil-2,3-O-HHDP-β-D-glucosa), casuarictina, (1-O-galoil-2,3/4,6-O-bisHHDP-β-D-glucosa).	<i>Monochaetum multiflorum</i>	Isaza <i>et al.</i> , 2004.
Nobotaninos O y P, stachyurina, casuarinina, madinillina B, nobotaninos A, B, D, F, G, J y M, pedunculagina, casuarictina.	<i>Tibouchina multiflora</i>	Yoshida <i>et al.</i> , 1999.
Thonningianinos A y B.	<i>Thonningia sanguinea</i>	Ohtani <i>et al.</i> , 2000.
Ácido elágico -4-arabinosa, sanguina H-6, sanguina H-10, lambertianina C, ácido elágico-4-acetilxilosa, ácido elágico-4-acetilarabinosa.	<i>Rubus spp.</i>	Mullen <i>et al.</i> , 2003.
Jolkinnina, geraniina, corilagina, carpinusina, putranjivaina, helioscopinina B, helioscopinina A.	<i>Euphorbia jolkinii</i>	Lee <i>et al.</i> , 2004.
Cuphiinos D ₁ y D ₂ , woodfordina C, mirycitrina, tellimagrandina II, oenotheina B.	<i>Cuphea hyssopifolia</i>	Chen <i>et al.</i> , 1999
Phyllanemblininos A, B y F, corilagina, 1-(β),2,3,6-tetra-O-galoilglucosa, chebulanina, ácido quebulágico, elaeocarpusina, punicafolina, tercatina, mallonina, putranjivaina A.	<i>Phyllanthus emblica</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2001
Elanienina B y stenophyllanina A	<i>Cowania mexicana</i>	Ito <i>et al.</i> , 1999.
Casuarictia, pedunculagina, tellimagrandina I, strictinina, casuarinina, stachyurina, praecoxin A, B, C, D, E, rugosin C y F, 2,3-O-[(S)-hexahidroxidifenoil]-D-glucosa.	<i>Strachyurus praecox Sieb. Et Zucc.</i>	Okuda <i>et al.</i> , 1993.
Ácido elágico 4-O-α-L-ramnopiranos 6-O-galoil-2,3-S-haxahidroxifenoil-(α/β)-D-glucopiranos, coralagina, 3,3'-di-O-metil ácido elágico, 3'-O-metil-3,4-metilendioxi ácido elágico. puniacorteina D, punicalina, punicalagina, 2-O-galoilpunicalina, ácido dielágico ramnosil (1-4) glucopiranos y 5-galoilpuniacorteina D.	<i>Punica granatum</i>	El-Toumy <i>et al.</i> , 2001; El-Toumy <i>et al.</i> , 2002; Machado <i>et al.</i> , 2001; Seeram <i>et al.</i> , 2003.
Acalifidinas M ₁ M ₂ y D ₁ ,	<i>Acalypha hispida</i>	Amakuta <i>et al.</i> , 1999.
Largerstroemina, tlorina B y reginina A	<i>Largerstroemia speciosa</i>	Hayashi <i>et al.</i> , 2002.

Los frutos de bayas ampliamente reportados, son fresas, arándanos, frambuesas, zarzamora, mora (Constantin, 1997; Kähkönen *et al.*, 2001; Lei *et al.*,

2001; Mullen, 2002; Wada y Ou, 2002; Vatter y Shetty, 2003; Määttä-Riihinen *et al.*, 2004), también se encuentran en nueces, raíces y hojas de diferentes plantas. (ver Tabla 2).

Tabla 2. Plantas ricas en elagitaninos de importancia económica usadas como alimentos.

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>	Persimonia	
<i>Fagaceae</i>	<i>Castanea sativa</i>	Castaña	
<i>Juglandaceae</i>	<i>Juglans regia</i>	Nuez	
	<i>Myrtaceae</i>	<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 persica</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 grossularia</i>	Grosella silvestre	
<i>Theaceae</i>	<i>Camelia sinensis</i>	Té verde	
<i>Vitaceae</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Uva	
	<i>Vitis rotundifolia</i>	Vino de uva (moscatel)	

Fuente: Clifford y Scalbert (2000).

2.5.6 Aplicaciones del ácido elálgico y de los elagitaninos

Debido a sus propiedades fisiológicas, el ácido elálgico y los elagitaninos han sido reportados principalmente por su efecto positivo sobre la salud. En la tabla 3 se presenta la actividad biológica, algunos mecanismos de acción y la fuente de la cual han sido obtenidos estos compuestos.

Otra aplicación de los elagitanino y del ácido elálgico es su capacidad de formar quelatos con metales (Przewloka y Shearer, 2002). Aun más los elagitaninos y el ácido elálgico en forma de elagatos o elagato respectivamente tienen 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 (Patente: CPE: 88109207.6).

Tabla 3. Aplicaciones fisiológicas de los elagitaninos y del ácido elálgico.

Propiedad fisiológica	Mecanismo de acción	Fuente
Anti-tumorales		Feldman <i>et al.</i> , 1999; Ito <i>et al.</i> , 1999; Wang <i>et al.</i> , 1999; Martens-Talcott <i>et al.</i> , 2003
Anti-viral		Uchiumi <i>et al.</i> , 2003; Ruibal <i>et al.</i> , 2003; Notka <i>et al.</i> , 2004
Anti-oxidante, anti-peroxidación	Neutralizando especies reactivas de radicales libres.	Tan <i>et al.</i> , 1991; Okuda <i>et al.</i> , 1993; Da Porto <i>et al.</i> , 2000; Gil <i>et al.</i> , 2000; Amakura <i>et al.</i> , 2000; Anderson <i>et al.</i> , 2001; Vatten y Shetty 2003; Olsson <i>et al.</i> , 2004; Fukuda <i>et al.</i> , 2003
Anti-mutagénicos	Se acomplejan con los compuestos causantes del estrés celular impidiendo la degeneración del ADN.	Tatsuo <i>et al.</i> , 1998
Activador del transporte de glucosa		Hayashy <i>et al.</i> , 2002
Anticolesterol	Prevención de problemas cardíacos, inhibe la biosíntesis de colesterol.	Abe <i>et al.</i> , 2001
Quimioprotector	Reduce la incidencia de N-2-fluorenilacetamida- inducida (tumor de hígado). N-nitrosometilbenzilamina (NMBA)- inducida (tumor de esófago).	Ahn <i>et al.</i> , 1996
antibacteriales	Contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	Akiyama <i>et al.</i> , 2001

De manera natural los elagitaninos y el ácido elálgico reaccionan durante la elaboración de bebidas fermentadas precipitando proteínas, permitiendo la clarificación de los productos; también le dan un sabor característico a los vinos y destilados alcohólicos que son almacenados en barricas naturales de árboles maderables como el roble, impartiendo sabor y aroma característicos.

2.5.7 Biodegradación de elagitaninos

Existen varios reportes sobre la biodegradación de galotaninos. Está es llevada a cabo por la enzima tanasa, tanino acil hidrolasa (E.C. 3.1.1.20),

generalmente referida como tanasa, la cual presenta actividad esterasa e hidroliza los enlaces éster de estos compuestos. Nuestro grupo ha reportado diversos estudios sobre la tanasa producida por *Aspergillus niger* Aa-20, la cual es una enzima inducible (Aguilar, 2001). Existe amplia información referente a esta tanasa, particularmente en estudios de producción, recuperación, purificación, caracterización y aplicación (Belmares *et al.*, 2004; Aguilar *et al.*, 2007)

En el caso en particular de la biodegradación de elagitaninos, Scalbert (1991) y Vivas *et al.* (2004) mencionaron que no existían reportes sobre la biodegradación de elagitaninos hasta esa fecha. Además, Saavedra *et al.* (2005) mencionaron que la producción de ácido elálgico no ha sido completamente explotada por su elevado costo de obtención. Por su compleja estructura, los elagitaninos, no son hidrolizados fácilmente por métodos tradicionales. La degradación microbiana de elagitaninos se dificulta debido a su estructura compleja; particularmente, en el acoplamiento C-C del grupo HHDP de los elagitaninos. Sin embargo, dichos compuestos pueden ser degradados por algunas bacterias y hongos.

Una revisión de la literatura demuestra que las investigaciones recientes se han enfocado a la producción de ácido elálgico, lo que refleja la existencia de enzimas capaces de degradar los elagitaninos (Apéndice A).

En la literatura se citan tres tipos de enzimas involucradas en la degradación de elagitaninos. La primera es la β -glucosidasa reportada por Vatten y Shetty (2003) para la producción de ácido elálgico a partir de pomaza de arándano en cultivo en medio sólido, la segunda es la valonea tanino hidrolasa reportada por Huang *et al.* (2005) empleando extractos de taninos de valonea en cultivo sumergido y más recientemente Mingshu *et al.* (2006) atribuyen a la enzima tanasa la degradación de elagitaninos. Estos autores indican erróneamente en su publicación que Osawa *et al.* (2000) y Vaquero *et al.* (2004) reportaron que la enzima tanasa producida por especies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* o *Pediococcus* les confiere a dichos microorganismos la capacidad de degradar materiales ricos en galotaninos, elagitaninos y taninos condensados de uva muscadina. Sin embargo, dichos reportes se enfocan solamente a la producción de la enzima tanasa por bacterias lácticas sin asociar o relacionar dicha actividad enzimática con la producción de ácido elálgico.

Existen reportes de la aplicación de la enzima tanasa para la degaloilación selectiva de elagitaninos complejos para obtener otros elagitaninos. Entre estos

reportes se encuentra el publicado por Yoshida *et al.* (1999), quienes emplearon la enzima tanasa producida por *A. niger* para la “síntesis” de un elagitanino; la reacción fue monitoreada por cromatografía de líquidos; a partir del compuesto nobotanino P, obtuvieron el nobotanino K y ácido gálico libre; solo se logró la degaloiación del compuesto de partida.

Otra prueba de la hidrólisis selectiva del grupo galoilo de los elagitaninos con la enzima tanasa, se llevó a cabo en los elagitaninos phillanemblinina D-F, para obtener los elagitaninos D_a-F_a más ácido gálico. En todos los casos, la hidrólisis de los elagitaninos fue corroborada por medio de separaciones cromatográficas seguidas de análisis de espectrometría de masas (Zhang *et al.*, 2001). Los estudios anteriores demostraron que la enzima no fue capaz de liberar el grupo hexahidroxidifenilo.

Ramírez-Coronel *et al.* (2003) reportaron una enzima tanasa de *A. niger* AA 20 con actividad β-glucosidasa. Esta enzima podría ser también responsable de la hidrólisis de elagitaninos. En un experimento singular Lee y Talcott (2004) extrajeron los elagitaninos de uva muscadina silvestre, los hicieron reaccionar con α-glucosidasa, mostrando mayor reactividad por los xilosidos del ácido elágico (3,14 a 1,05 mgkg⁻¹) que la observada con fracciones de ramnósidos. La incubación con tanasa no reveló ninguna actividad específica para los glucósidos de ácido elágico o para unidades de hexahidroxidifenilo de elagitaninos. Sin embargo, el uso de tanasa provocó un incremento significativo de la liberación de ácido gálico; lo cual indica la presencia de galoilos esterificados en la molécula de los elagitaninos.

En 2007 se presentaron algunos reportes de Hung *et al.* (2007a y 2007b), en los que, al igual que en el presente trabajo, le dan seriedad al hecho de que la enzima responsable de la hidrólisis de los elagitaninos, la elagitanino acil hidrolasa es diferente a las reportadas anteriormente. Aguilera *et al.* (2008b) la reportan como la actividad hidrolizante de elagitaninos (AHE) (Apéndice C).

En la figura 5 se esquematiza la biodegradación de los elagitaninos. Dependiendo del grado de complejidad de los elagitaninos se pueden proponer diferentes rutas de degradación. *A priori* se proponen dos posibles rutas primarias, la primera en donde se tiene un elagitanino con grupos galoilos esterificados, generando galoilglicósidos, después se lleva a cabo la hidrólisis por la enzima tanasa (TAH) liberando ácido gálico y glucosa, que se metabolizan bajo rutas ya descritas, hasta la formación de coenzima A y piruvato respectivamente. En la segunda ruta,

los elagitaninos no complejos y libres de grupos galoilo, se hidrolizan a elagiloilglicósidos más una molécula de HHDP, el elagiloilglicósido se hidroliza nuevamente liberando una molécula de HHDP y una de glucosa. No se tiene evidencia de la enzima responsable de liberar el grupo HHDP de los elagitaninos por eso se indica con la simbología *E?*; posteriormente, el grupo HHDP se lactoniza espontáneamente, para estabilizar la molécula, formándose el ácido elágico, que puede seguir dos posibles rutas de degradación: la ruta del ácido gálico o la degradación hasta urolitinas encontradas en investigaciones *ex vivo* como moléculas del la degradación de ácido elágico (Cerdea *et al.*, 2004).

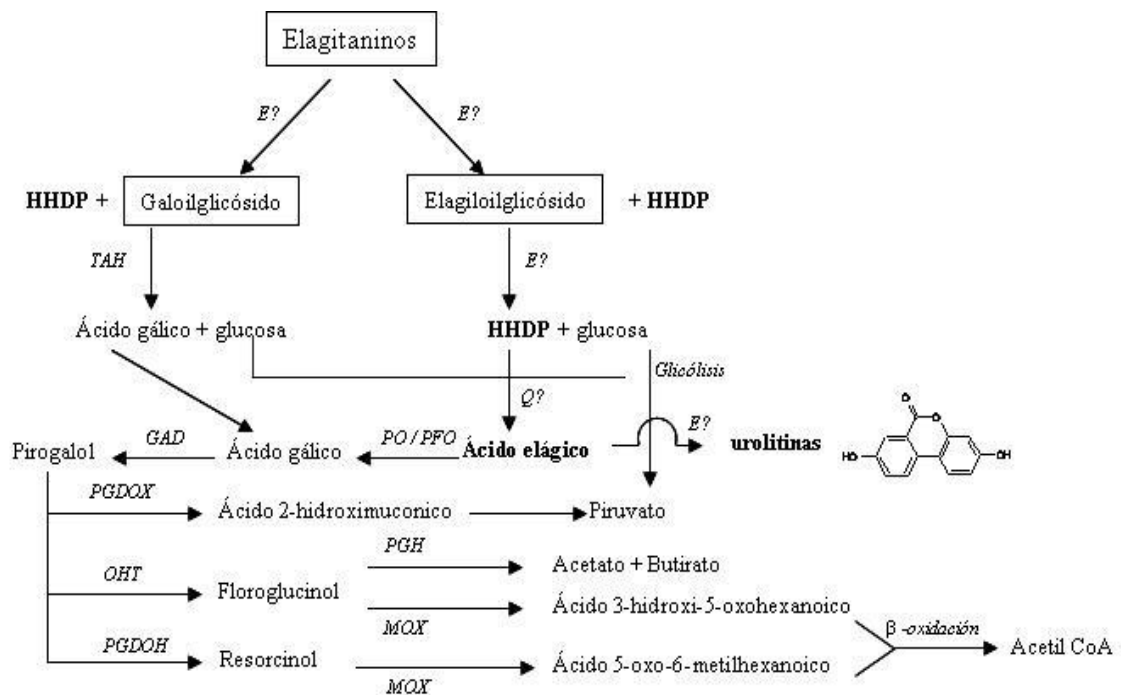


Figura 5. Esquema de la biodegradación de elagitaninos. *E?*, enzimas no conocidas; *TAH*, tanino acil hidrolasa; *PO*, peroxidasa; *PFO*, polifenoloxidasas; *GAD*, ácido gálico descarboxilasa; *PGDOX*, pirogaloldioxigenasa; *OHT*, hidroxiltransferasa; *PGDOH*, pirogaloldeshidrogenasa; *PGH*, floroglucinol hidrolasa; *MOX*, monooxigenasa; *Q?*, Lactonización espontánea o catalizada por una enzima.

Hasta el momento, no ha sido publicado trabajo alguno, sobre la purificación de enzimas con la capacidad de hidrolizar elagitaninos, por lo que, es necesario elucidar de manera precisa los mecanismos de biodegradación de los elagitaninos; lo que permitirá diseñar, controlar y optimizar procesos de producción de ácido elágico y elagitaninos de bajo peso molecular. Con ello, será posible diseñar procesos de bio-remediación para la degradación de material contaminante de suelos y efluentes de la industria de la curtiduría.

2.6 Fuentes potenciales de elagitaninos

Las fuentes de elagitaninos son muy variadas, sin embargo, aun existen biotipos de la Republica Mexicana que no han sido explorados, por lo que a continuación se describen algunas fuentes potenciales de elagitaninos.

2.6.1 Gobernadora (*Larrea tridentata*)

Esta planta se distribuye abundantemente en el norte de México, de la península de Baja California, Chihuahua, Durango, Zacatecas, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas e Hidalgo a una altitud de 400 a 2000 m. La gobernadora es un arbusto que se encuentra distribuido ampliamente en el desierto de Norteamérica (González, 1968; Benson y Darrow, 1981). Se estima que cubre alrededor de 50 millones de hectáreas.

La gobernadora crece en los sitios más secos de México, en terrenos planos, laderas y en planicies aluviales. Se puede desarrollar en lugares con temperaturas de 14 a 25° C y presencia de 8 meses de sequía, en climas áridos y muy áridos. Los suelos en los que se desarrolla son de profundidad variable, de textura franco arenosa, estructura granular y aluvial con pH de 6.8 a 7.6 (Coville 1983).

El tamaño de la gobernadora varía de 30 a 60 cm de altura con una cobertura mayor a la de su altura. Esta planta contiene aproximadamente 50 g de hojas y tallos que representan alrededor de 3/10 de su peso total (Botkin, 1949).

El nombre científico de la gobernadora es *Larrea tridentata*, Cov, y pertenece a la familia de las *Zigophthiaceae*, arbusto xerófito de olor fuerte, con hoja persistente, compuestos de dos folículos oblongos unidos a la base, de unos 5 y 10 mm, posee frutos de 5 carpelos densamente pilosos (De las Fuentes, 1970). A medida que avanza la edad, el tronco se engruesa y el número de ramas aumenta. En plantas adultas el tronco es de 15 a 20 cm. El follaje está en su mayor parte al final de las ramas y su color varía dependiendo de las condiciones climatológicas, cuando existen condiciones extremas de sequía pierde hasta un 80 % del área foliar (Sherve, 1964). La fecundación se lleva a cabo por medio de insectos y sus frutos son arrastrados por el viento o por los animales (Wettstein, 1994). La gobernadora en América se le conoce con diversos nombres, tales como: arbusto de cerosota, guamis, falsa alcaparra y hediondilla (Standley, 1961).

La tabla 4 presenta la composición de la gobernadora.

Tabla 4. Caracterización fisicoquímica de la gobernadora.

Componente	Belmares-Cerda (2004) %	Mercado-Martínez (2006) %
Materia seca total	94.11	91.27
Cenizas	8.02	8.50
Proteína	4.29	6.34
Fibra cruda	18.84	19.62
Grasas	2.58	3.89
Azúcares totales	9.26	13.50
Azúcares reductores	9.12	0.82

Botkin (1949) analizó la composición botánica de la gobernadora, expresándose en porcentaje del total para cada uno de los componentes en base seca como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición botánica de la gobernadora en base seca.

Parte de la planta	Peso (g)	Total (%)
Troncos y ramas	180	54
Raíces	75	23
Hojas y ramas verdes	50	23
Total	305	100

Fuente: Botkin, 1949.

A través del tiempo a la gobernadora se le han dado diferentes usos, como por ejemplo, para afecciones y padecimientos de los riñones y fiebre se toma una taza de té tres veces al día, para reumas se pone cataplasma en la parte adolorida, para la fiebre con frío, se hierve la rama de la gobernadora en un litro de agua y se toma tres veces al día; para la mujer que no puede tener hijos, se hierve la rama en un litro de agua y se toma un vaso diario.

Es empleada para baños y fomentos contra reumas, moretones y llagas; también puede ser tomada como antiséptico contra perturbaciones gástricas, entre otros usos que se reportan.

2.6.2 Hojasén (*Fluorensia cernua* D. C)

El hojasén es una especie ampliamente distribuida, ocupando una extensa área en el Norte de América. Es frecuente encontrada en suelos con gran cantidad de carbonato de calcio y suelos arenosos (Blake, 1913; Buffington y Herbel, 1956). En México se encuentra en los estados de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Zacatecas y México D. F. (Vines, 1960; Silva, 1980). En los Estados Unidos de Norteamérica se localiza en el Oeste de Texas y en el sur de Nuevo México y

Arizona (Vines, 1960). Se encuentra en altitudes que van de los 1000 a 2000 m (Gay *et al.*, 1970). Estudios realizados en México demuestran que la altitud predominante para esta especie son los 1900 m y pendientes del 1 al 6 % (Arredondo, 1981; González, 1975; Silva, 1980; Siller, 1980); aunque también se le encuentra en altitudes de 300 a 400 m en el noreste de Coahuila (Belmares-Cerda, 2004).

El hojaseén es un arbusto ramificado de hasta dos metros de altura que exuda una sustancia resinosa con olor a alquitrán (Correl y Johnston, 1970). Sus ramas son delgadas, resinosas, de color café a gris, sus hojas son alternas, simples, elípticas a oblongas de 17.0 a 25.0 mm de largo y de 6.5 a 11.5 mm de ancho; las flores en corimbos o panículas, cabezuelas casi sésiles de 1 cm de diámetro de color amarillo (Vines, 1960). Su fruto es un aquenio de 6 mm de largo y 2 mm de ancho, lateralmente comprimido, ápice muy veloso y de 2 a 4 aristas desiguales y ciliadas de 2 a 3 mm de largo, casi obscurecidas por los pelos largos del aquenio (Benson y Darrow, 1981; Correl y Johnston, 1970, Vines, 1960).

El nombre científico del hojaseén es *Fluorensia cernua* D. C. y pertenece a la familia de las *Asteraceae* (*Compositae*), los nombres comunes que se le dan en Estados Unidos de Norteamérica son: Tarbush, hojase, american tarbush, black brush, barniz-brush y hojaseén (Benson y Darrow, 1981; Correl y Johnston, 1970; Gay *et al.*, 1970; Vines, 1960). En México se le conoce como hojaseén, arbusto de alquitrán y escobilla negra (Arredondo, 1981). La literatura reporta la composición de distintos componentes del hojaseén, los cuales se muestran en la tabla 6 (Martínez-Hernández, 2003; Belmares-Cerda, 2004 y Mercado-Martínez, 2006).

Tabla 6. Caracterización fisicoquímica de hojas de hojaseén.

Componente	Martínez-Hernández (2003) %	Belmares-Cerda (2004) %	Mercado-Martínez (2006) %
Materia seca total	96.91	96.24	97.46
Cenizas	11.2	12.14	9.64
Proteína	17.64	5.62	30.57
Fibra cruda	8.44	10.04	10.54
Grasas	8.29	8.55	7.31
Azúcares totales	3.57	10.68	13.59
Azúcares reductores	3.17	8.42	0.93

Estudios químicos realizados por Jones y Earle (1966) en semillas de hojásén, encontraron un 16.2 % de proteína, 6.6 % de aceite y un examen positivo de taninos; por otra parte, también se encontraron escasas cantidades de alcaloides en las partes aéreas de la planta (hojas, ramas y flores).

Actualmente, los campesinos de México utilizan esta especie como cercas vivas y protección de cultivos, para techos y paredes de construcción rural y como remedio para problemas digestivos (Arredondo, 1981). Soluciones de hojas de hojásén en concentraciones de hasta 100 ppm han demostrado propiedades fungicidas controlando un 100 % de especies como *Rhizoctonia solani*, *Pythium sp* y *Fusarium oxysporum*, por lo que tiene potencial como fungicida agrícola (Hosseini y Maldonado, 1982).

2.6.3 Candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*)

El nombre común de la planta “candelilla” parece provenir de la forma particular de los tallos del arbusto, largos, rectos, erectos y recubiertos de cera los cuales presentan la apariencia de pequeñas velas (“*candles*” en el idioma Inglés). Algunas otras versiones indican que la hierba de candelilla se quemaba directamente para iluminación, haciendo las funciones propias de una vela.

La planta de candelilla pertenece a la familia de las *Euforbiáceas*, nombre común de una extensa familia de plantas con flores de aspecto similar a los cactus de quienes se diferencian claramente por el látex lechoso que contienen las *Euforbiáceas*.

La planta crece normalmente en zonas de clima semidesértico, principalmente en laderas de suelo calcáreo, asociadas con formaciones de material rocoso. La raíz de la planta es relativamente pequeña, aunque una planta de tamaño moderado puede desarrollar más de 100 tallos de color verde grisáceo, con dimensiones típicas de 30-60 cm de largo y de 0.1-1.0 cm de diámetro, dando lugar a la formación de arbustos de un tamaño aproximado de 90 cm de diámetro.

La planta de candelilla se llena de pequeñas flores color de rosa en la temporada de lluvias. Las formaciones de candelilla son más abundantes en altitud de 800 m y se asocian comúnmente con el crecimiento de plantas de lechuguilla, sotol, pasto chino, ocotillo y cactus diversos. La planta de candelilla es muy resistente al ataque de plagas y enfermedades y se consume de forma muy limitada por algunas especies de la fauna silvestre que existe en la región.

En 1829 el Botánico J.G. Zuccarini (Treviño-Cueto, 2006) describió por vez primera a la planta de candelilla con el nombre científico *Euphorbia antisyphilitica*, reconociendo las propiedades medicinales del jugo de la planta como un remedio utilizado por los indígenas para tratar la enfermedad venérea de la sífilis. En la actualidad, la candelilla se considera útil para el tratamiento de padecimientos diversos. La tabla 7 muestra la caracterización fisicoquímica de la planta.

Una nueva clasificación de la candelilla fue presentada en 1909 por G. Alcocer, quién la nombró *Euphorbia cerífera*, destacando las propiedades de la planta para la generación de cera, la cual le sirve como elemento de protección y sello para la retención de humedad.

Durante la época de lluvias, los tallos de la candelilla se llenan de una savia espesa, la cual en la época de secas recubre el tallo con cera para evitar la evaporación. Aún en épocas de sequía severa, el mecanismo protector de la Candelilla ha demostrado su efectividad.

Hace casi un siglo, *The Journal of the Royal Society of Arts* declaró que “la planta silvestre conocida como “candelilla” contiene cera de excelente calidad y en suficiente cantidad, lo que le convierte en una especie “sumamente valiosa”. La explotación de la candelilla en estado silvestre para la producción de cera se convertiría, desde entonces, en una de las actividades económicas más importantes, en todas aquellas zonas rurales donde crece la planta.

Tabla 7. Caracterización fisicoquímica de la candelilla.

Componente	%
Materia seca total	99.60
Cenizas	10.89
Proteína	2.32
Fibra cruda	9.05
Extracto etéreo	15.92
Azúcares totales	0.27
Azúcares reductores	0.15

Fuente: López-Guerra (2006)

Se tiene conocimiento de que la candelilla ya era usada por las tribus indígenas apaches que habitaban la región norte de México y que la utilizaban en tratamientos medicinales para curtir pieles y tensar sus arcos para las batallas contra otras tribus. El principal producto que se obtiene de la candelilla es la cera, la cual tiene numerosos usos industriales.

México es el principal y casi único productor de cera de candelilla en el mundo y Coahuila es el estado líder, seguido por Zacatecas, Durango y Chihuahua. La venta de la cera tiene dos vías: las exportaciones que representan alrededor de 80 % de la comercialización total y las ventas nacionales con 20 %.

2.6.4 Sangre de drago (*Jatropha dioica*)

El nombre botánico de esta planta es *Jatropha dioica*, conocida comúnmente como sangre de dragón o sangre de drago. Se encuentra agrupada dentro de las siguientes categorías taxonómicas, reino: vegetal, división: *Embriophyta siphonoma*, subdivisión: *Angiospermae*, clase: *Dicotyledoneae*, orden: *Geraniales*, familia: *Euphorbiaceae*, género: *Jatropha*, especie: *jatropha dioica* (Lawrence, 1951). Abarca aproximadamente 150 especies del género *Jatropha* (Hoffman-Lawrence, 1951). Por sus características se considera como una planta micrófita, multidendrular, inerme (Rzedowski, 1978). El hábitat de esta planta es en climas secos, en suelos muy pedregosos de las sierras, aunque se logra desarrollar en las faldas de los cerros (Blanco *et al.*, 1983). Es una especie capaz de crecer en zonas perturbadas en donde es muy difícil que crezcan otras especies.

La *Jatropha dioica* es una planta semileñosa, herbácea, de 30 a 60 cm de altura, con tallos negro-rojizos y raíces tuberosas que cuentan con la característica de que al ser cortadas les brota un líquido semejante a la sangre; tal vez por esto la población del estado de Coahuila la conoce como “sangre de dragón” o “sangre de drago” y la ha utilizado desde hace mucho tiempo para fijar los dientes con movimiento y para curar la piorrea. La planta se encuentra en varios municipios de Estado de Coahuila, además en San Luis Potosí, Zacatecas, Hidalgo y Guanajuato. En la tabla 8 se muestra la caracterización fisicoquímica de la planta sangre de drago.

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica de sangre de drago.

Componente	%
Materia seca total	100
Cenizas	11.23
Proteína	5.31
Fibra cruda	25.74
Extracto etéreo	2.5
Azúcares totales	0.29
Azúcares reductores	0.15

Fuente: López-Guerra (2006)

Desde que se inicia en el país el estudio de esta planta, se le ha detectado utilidad para endurecer las encías, afirmar los dientes actuando sobre los tejidos que

los sostienen y en el tratamiento de otras alteraciones bucales. En los últimos resultados se reporta que tiene actividad antimicrobiana (Escareño-Piña, 2003). Se usa principalmente en forma de infusiones con el extracto de la planta como medicamento para la vaginitis, uretritis, blenorragia, nefritis, gastroenteritis, estomatitis, conjuntivitis, congestión renal, amigdalitis y como antiséptico local (González 1979; Cantúa, 1987).

2.6.5 Granada (*Punica granatum*)

El granado es uno de los frutales más antiguos cultivados en la península ibérica. Su origen es centroasiático pero en muchas zonas ya se ha naturalizado. Es frecuente verlo representado en esculturas clásicas, en frescos medievales e incluso formando ornamentos en la arquitectura de catedrales y edificios antiguos.

Su nombre científico es *Punica granatum*, y pertenece a la familia de las punicáceas. Este nombre le fue atribuido por los romanos, ya que este arbusto fue introducido en las zonas mediterráneas por los cartagineses durante las Guerras Púnicas.

Pequeño árbol caducifolio, a veces con porte arbustivo, de 3-6 m de altura, con el tronco retorcido. Madera dura y corteza escamosa de color grisáceo. Algunas ramas a veces espinosas, ramillas angulosas, copa extendida y con mucho ramaje. Hojas simples, opuestas, generalmente fasciculadas, cortamente pecioladas, oblongas u oval-lanceoladas, de 3-8 cm de longitud, algo coriáceas y de color verde lustroso. Flores solitarias o reunidas en grupos de 2-5 al final de las ramas nuevas. Son grandes y de color rojo, lustrosas, acampanadas, subdentadas, con 5-8 pétalos y sépalos, persistiendo el cáliz en el fruto. En algunas variedades las flores son abigarradas e incluso matizadas en blanco. Florece en mayo-julio, aunque algunas variedades lo hacen más tarde. Su fruto en baya denominado "balausta" es globoso, de 10-15 cm de diámetro, con la piel correosa de amarillenta a rojiza y con numerosas semillas envueltas en una pulpa comestible rosada.

Su cultivo en México está muy extendido sobre todo en la región de Hidalgo, Guanajuato, Sonora, Estado de México y Coahuila. España e Irán son los países donde más granados se cultivan.

La granada posee un alto contenido en potasio, necesario para la regulación del sistema nervioso central. Esto, unido a su bajo contenido en sodio, hace de la granada una fruta recomendable para personas con hipertensión y afecciones

cardiacas, prolongando la juventud y previniendo las enfermedades de tipo degenerativo. Siempre se ha atribuido a la granada un cierto valor afrodisíaco. Estudios recientes han descubierto que este poder actúa más sobre las mujeres que sobre los hombres. En la tabla 9 se muestra la caracterización fisicoquímica de la granada (cáscara).

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

Tabla 9. Caracterización fisicoquímica de la cáscara de granada.

Componente	Cantidad por 100 g de muestra. (g).
Materia seca total	94.45 ± 1.25
Cenizas	3.59 ± 0.08
Grasa cruda	3.57 ± 0.38
Proteína total	4.26 ± 0.17
Fibra cruda	19.90 ± 1.61
Azúcares totales	17.75 ± 0.61
Azúcares reductores	4.34 ± 0.01
Fenoles hidrolizables totales	6.11 ± 1.83

Fuente: Robledo-Olivo (2007).

Otros padecimientos tratados son los parásitos intestinales como lombrices y solitarias, para lo cual se toma la cocción concentrada a base de la corteza de la planta, raíz, hojas o la cáscara del fruto, mezclada con un poco de epazote, y el líquido obtenido se bebe en ayunas durante tres días. Se dice, además, que la granada mejora los malestares como el empacho, vómito, bilis, infección intestinal y fuegos bucales, en estos casos se toma el cocimiento o se aplica localmente y también se hacen gárgaras para mitigar las afecciones bucales. (Seeram, *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2002 ; Akiyama *et al.*, 2001 y Aviram *et al.*, 2000).



3. Justificación

En la actualidad, una gran cantidad de biomoléculas se asocian con propiedades “especiales” 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 el cáncer, enfermedades cardíacas, hipertensión, disminución del colesterol, inhibición de bacterias, parásitos y virus, como el VIH y Papiloma.

La forma tradicional de obtención de ácido elágico como se menciona en la introducción, es a través de procesos que involucran sustancias altamente contaminantes como ácidos y álcalis; además de un gasto elevado de energía calorífica, esto se debe principalmente a la falta de conocimiento sobre los procesos de degradación de los elagitaninos, que ha sido un factor limitante en el desarrollo de tecnologías biológicas que permitan obtener ácido elágico, por lo que es de gran importancia determinar el tipo de enzimas que se encuentran involucradas en dicho proceso.

Tomando en cuenta los avances logrados en el estudio de galotaninos y la producción fúngica de la tanasa y del ácido gálico, el presente proyecto plantea el estudio de la enzima involucrada en la biodegradación de elagitaninos. Este conocimiento proporcionará información valiosa para la generación de biotecnologías para la aplicación de las enzimas o los microorganismos involucrados en la degradación de elagitaninos y el desarrollo de procesos amigables con el medio ambiente.

En términos de aportaciones científicas, los resultados de la presente investigación resultan de gran relevancia por su originalidad, trascendencia y de potencial impacto para el sector biotecnológico de México.

Adicionalmente, el presente proyecto formó parte del proyecto ECOS-Nord MO2-AO2, relacionado con el estudio de las capacidades de degradación de taninos de la pulpa de café por hongos filamentosos provenientes de biotipos mexicanos. La

meta del proyecto consiste en descubrir el contenido de elagitaninos y su posible aprovechamiento como fuente de ácido elágico



4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Producir, purificar y caracterizar la enzima fúngica responsable de la hidrólisis de los elagitaninos presentes en una fuente vegetal.

4.2 Objetivos particulares

- 1.- Seleccionar a partir de cinco especies vegetales el material con mayor contenido de elagitaninos, así como, establecer y aplicar una estrategia para la extracción de elagitaninos de la fuente seleccionada.
- 2.- Seleccionar una o más cepas fúngicas con capacidad de degradación de elagitaninos.
- 3.- Desarrollar la metodología para la evaluación de la actividad elagitanasa producida por el hongo seleccionado.
- 4.- Producir por cultivo en soporte sólido la enzima responsable de la degradación de elagitaninos.
- 5.- Purificar el extracto enzimático obtenido por cultivo en medio sólido.
- 6.- Determinar el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad elagitanasa.



5. Metodología Experimental

La presente investigación se desarrolló en cinco etapas experimentales.

I.- Colecta y obtención del material vegetal, preparación del material para análisis y cuantificación de elagitaninos.

II.- Determinar la capacidad de las cepas fúngicas para emplear los elagitaninos como sustrato y seleccionar la cepa a utilizar en el bioproceso de producción de ácido elálgico.

III.- Producción de ácido elálgico y de la enzima degradadora de elagitaninos en cultivo en medio sólido.

- a) Usando el polvo de cáscara de granada como soporte y fuente de carbono y energía.
- b) Empleando espuma de poliuretano (PUF) como soporte y el extracto del polvo de cáscara de granada como fuente de carbono y energía.

IV.- Purificación del extracto enzimático obtenido por CMS e identificación de la enzima responsable de la degradación de elagitaninos.

V.- Caracterizar físico-químicamente de la enzima responsable de la degradación de elagitaninos.

5.1 Colecta y obtención del material vegetal, preparación del material para análisis y cuantificación de elagitaninos.

En esta sección se hace una descripción de los materiales vegetales evaluados, la selección de estos se realizó de acuerdo a las propiedades “curativas” por las que son empleados de manera tradicional, así como, la evaluación físico-química de las muestras y finalmente el análisis de elagitaninos.

5.1.1 Material vegetal.

Los materiales vegetales empleados en la presente investigación fueron plantas y frutos que se recolectaron en diferentes sitios del estado de Coahuila de Zaragoza.

5.1.1.1 Gobernadora (*Larrea tridentata* L.)

La gobernadora se recolectó en Saltillo, Coahuila, al costado de la carretera libre Saltillo-México a la altura del kilómetro 36, la muestra se colectó en el mes de Julio. Se obtuvieron 18 kg de planta en total, se separaron los tallos de las hojas, las cuales fueron utilizadas en el experimento.

5.1.1.2 Hojasén (*Flourenzia cernua* D.C.)

La planta de hojasén se recolectó en el ejido La Angostura, municipio de Saltillo, Coahuila, al costado de la carretera libre a Saltillo-Zacatecas a la altura del Kilómetro 20, se obtuvieron 18 kg de planta en total, la muestra se colecto en el mes de julio.

5.1.1.3 Candelilla (*Euphorbia antishyphyllitica* L.)

Se colectó en el ejido el Forlón, municipio de Ramos Arizpe Coahuila, en el kilómetro 62 de la carretera a Saltillo-Monclova. Se obtuvieron 12 Kg de planta, la muestra fue colectada en el mes de agosto. Se extrajo la cera de candelilla, de acuerdo a la metodología proporcionada por los pobladores y referida por Saucedo-Pompa (2007).

5.1.1.4 Sangre de Drago (*Jatropha dioica* L.)

La sangre de drago se colectó en la falda sur del cerro del pueblo en la ciudad de Saltillo Coahuila, se obtuvieron 7 Kg de planta, en los meses de agosto-septiembre.

5.1.1.5 Cáscara de granada (*Punica granatum* L.)

Se recolectaron 50 Kg de frutos de granada en un huerto familiar en la Ciudad de Sabinas, Coahuila (frutos maduros) y 120 kg en los municipios de Parras de La Fuente, Arteaga y Saltillo, Coahuila (frutos de maduración intermedia). Las granadas fueron fraccionadas en arilos (comúnmente conocidos como semillas) y cáscara. Las muestras se colectaron en los meses de agosto-octubre.

5.1.1.6 Deshidratación de las muestras vegetales

La gobernadora (*L. tridentata*) y el Hojasén (*F. cernua*) se cubrieron con mantas para evitar la exposición directa al sol y se deshidrataron a temperatura ambiente durante 5 d (verano). Una vez seco el material (10-12 % de humedad) se procedió a separar las ramas grandes de las hojas y ramas pequeñas, Las hojas se colocaron en una estufa (Koleff LK 26) a 60°C hasta 5 % de humedad en las muestras.

La candelilla (*E. antishyphylitica*), sangre de drago (*J. dioica*) y cáscara de granada (*P. granatum*) se deshidrataron directamente en estufa (Koleff KL 26) a temperatura de 60 °C, hasta 5 % de humedad en las muestras, tiempo estimado entre 48-72 h.

5.1.1.7 Molienda del material vegetal

Las muestras secas se molieron en un homogenizador industrial de 5 L, Modelo LP12 Serie 600-182 marca JR Maquinaria para mercado S.A. de C.V., para obtener un polvo el cual posteriormente fue tamizado por malla No. 30 (600 µm) para obtener un material homogéneo.

5.1.2 Cuantificación de elagitaninos

El polvo se sometió a hidrólisis de acuerdo a la técnica de Lei (2002), que consiste en colocar 300 mg de muestra y adicionar 4950 µL de metanol y 50 µL de HCl 6 M. Esta mezcla se calentó a 120 °C en autoclave en seco por 2 h. Posteriormente, se filtró el contenido de los tubos (membranas de 0.45 µm), el filtrado se centrifugó a 6000 rpm a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en metanol, se repitió la operación de centrifugación y re-suspensión y el último precipitado se consideró como ácido elálgico; que fue determinado por espectrofotometría (Wilson y Hagerman, 1990) (ver 5.1.2.1) y por cromatografía de líquidos de alta resolución (ver 5.1.2.2).

5.1.2.1 Determinación espectrofotométrica de ácido elálgico. (Método de Wilson y Hagerman, 1990)

Como estándar se empleo ácido elálgico grado analítico (ICN biomedical Inc. USA). Se colocaron 10 mg del reactivo analítico o de muestra vegetal en tubos Eppendorf de 2 mL. Se adicionó 1 mL de H₂SO₄ 2N y se congeló a -20 °C. Una vez congelados los tubos se transfirieron a una estufa a 100 °C por 24 h para hidrolizar la muestra. Al finalizar el tiempo de hidrólisis se temperaron a 25 °C o a temperatura ambiente, se abrieron los tubos y su contenido se filtró (Whatman No. 41), inmediatamente después se adicionaron 9 mL de piridina sobre el papel filtro y se completó a 10 mL como volumen final de la muestra. En un tubo de ensayo limpio y seco se transfirió 1 mL de la muestra y se adicionaron 1.1 mL de piridina, 0.1 mL de HCl concentrado y se mezcló. La muestra se incubó por 5 min a 30 °C, después se agregó 0.1 mL de NaNO₂ 1 % (p/v) se agitó suavemente e inmediatamente se registró la lectura a 538 nm en un espectrofotómetro. Las muestras se incubaron

nuevamente a 30 °C por un periodo de 36 min. Transcurrido este tiempo se registró nuevamente la lectura a 538 nm.

La diferencia entre la absorbancia inicial y la absorbancia después de 36 min es proporcional a la concentración de ácido elágico en las muestras.

El fundamento de la reacción se basa en la nitración de los hidroxilos del ácido elágico formando un cromóforo color naranja.

La primera lectura es para eliminar el error de otras moléculas que pueden reaccionar con el nitrito de sodio, como el ácido gálico, el cual reacciona en pocos minutos.

5.1.2.2 Determinación cromatográfica (HPLC) de ácido elágico

El análisis se realizó empleando un equipo Varian Pro Star 3300, aplicando una modificación al método de Amakura (2000), con un detector de fotodiodos (PDA Pro Star 300) a 254 nm, una columna Optisil ODS (5µm; 250 x 4.6mm) a 25°C. Se empleó un régimen isocrático donde la fase móvil consistió en acetonitrilo (solvente A) y agua acidificada con H₃PO₄, a pH 2.5 (solvente B) en una relación 30:70, flujo de 0.7 mLmin⁻¹, volumen de inyección 10 µL.

Las muestras se diluyeron 1:1 en metanol y se filtraron por membranas de 0.45 µm.

5.1.3 Caracterización físico-química del material seleccionado

La caracterización físico-química del material vegetal consistió en la determinación por triplicado de la materia seca total, humedad, ceniza, grasa cruda, proteína, fibra cruda y pH mediante los procedimientos descritos por la AOAC, 1996. También se determinaron los azúcares totales y azúcares reductores (Dubois *et al.*, 1956; Miller *et al.*, 1989), ácido elágico (Wilson y Hagerman, 1990) y el contenido de fenoles hidrolizables totales (Makar *et al.*, 1993).

5.1.3.1 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).

La materia seca total obtenida fue calculada mediante la fórmula:

$$\% \text{ materia seca total} = \frac{\text{crisol con muestra seca} - \text{crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (1)$$

5.1.3.2 Determinación de humedad

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

5.1.3.3 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 (Barnstead/Thermolyne 47900) a una temperatura de 500°C por 5 h (AOAC, 1996). El porcentaje de cenizas en la muestra se calculó mediante la expresión:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{crisol con ceniza} - \text{crisol solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (2)$$

5.1.3.4 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 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 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). El por ciento de grasa obtenido fue calculado mediante la expresión:

$$\% \text{ grasa} = \frac{\text{peso matraz con grasa} - \text{peso matraz solo}}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (3)$$

5.1.3.5 Determinación de proteína cruda

La determinación de proteína se realizó por el método Kjeldhal en el cual se colocó 1 g de muestra seca en un matraz Kjeldhal, 6 perlas de vidrio, 3 g de catalizador selenio y 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. Estos reactivos fueron adicionados en otro matraz excepto la muestra de granada como control. Los matraces se colocaron en el digestor Kjeldhal a una temperatura de 100°C hasta obtener una mezcla color café traslúcido y un color cristalino en el matraz sin muestra (incoloro). Una vez frías las mezclas, se adicionaron 300 mL de agua destilada, 110 mL de hidróxido de sodio y 5 granallas de zinc. Posteriormente, se

obtuvieron 200 mL de destilado de cada muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se titularon con ácido sulfúrico 0.099 Normal (N).

El nitrógeno obtenido se calculó mediante la fórmula (4):

$$\% \text{ nitrógeno} = \frac{(mL H_2SO_4 \text{ gastados} \times N H_2SO_4) - (mL \text{ gastados blanco} \times N \text{ blanco})}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

Finalmente, el por ciento de proteína cruda se calculó multiplicando el porcentaje de nitrógeno por el factor 6.25 indicado por la AOAC (1996).

5.1.3.6 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 midieron 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 marca Termolyne 200 (AOAC, 1996). El por ciento de fibra se calculó mediante la fórmula:

$$\% \text{ fibra} = \frac{\text{peso crisol muestra seca} - \text{peso crisol con cenizas}}{\text{gramos de muestra}} \times 100 \quad (5)$$

5.1.3.7 Determinación del pH

Se llevó a cabo en un medidor de pH (Corning, modelo H20). El equipo se calibró con soluciones amortiguadoras de 2, 4 y 7. Se introdujo el electrodo en las soluciones de las muestras, después de cada medición el electrodo de enjuagó con abundante agua destilada.

5.1.3.8 Determinación de azúcares totales y reductores

Los azúcares totales y reductores se evaluaron por los métodos de reportado por Dubois (1956) con fenol-sulfúrico y por el método de Miller, (1989) con DNS respectivamente, en el extracto filtrado en papel Whatman No. 41, de una solución de la muestra en agua destilada, se leyó a 480 nm para azúcares totales y 540 nm para azúcares reductores. Se preparó una curva patrón de sacarosa para azúcares totales y una curva patrón de dextrosa para azúcares reductores.

5.1.3.9 Determinación de fenoles hidrolizables totales (FHT)

Para el análisis de fenoles hidrolizables totales se siguió la metodología reportada por Makkar *et al.* en 1993. Se colocaron 800 µL de la muestra en tubo de ensayo (16 x 150), al mismo tubo se le adicionaron 800 µL del reactivo comercial Folin Ciocalteu, se agitó y se dejó reposar por 5 min, después se adicionaron 800 µL de carbonato de sodio 0.01M, se agitó y se dejó reposar por 5 min. Posteriormente, se añadieron 4 mL de agua destilada. Se registró la lectura obtenida en un espectrofotómetro a 725 nm. La curva de calibración se hizo con ácido gálico.

5.1.3.10 Determinación de pectina

Se pesaron 10 g de la muestra en polvo y se colocaron en un vaso de precipitados de 500 mL. Se agregaron 100 mL de agua destilada caliente y se sometió a ebullición por dos minutos; transcurrido el tiempo se desechó el agua, en la cual se disolvieron las sales, se repitió el lavado. Después del tercer lavado se adicionaron 100 mL de agua destilada caliente y se adicionó, gota a gota, HCl 6N hasta que se alcanzó un pH 2; se registró el volumen final. El vaso de precipitados se tapó con un reloj de vidrio y se colocó a ebullición por 15 min, El líquido evaporado se repuso con agua destilada caliente al nivel inicial y se hirvió por tres minutos más. Se filtró en papel Whatman No, 41, se recogió el filtrado en un vaso de precipitados de 250 mL y se lavó el residuo con 200 mL de con agua acidulada a pH 2, esto se repitió 5 veces. Se redujo el volumen al 50 % por evaporación y después se agregó una cantidad de etanol al 70 % cuyo volumen fue 1.5 veces del volumen filtrado y reducido, se agitó con una varilla de vidrio para precipitar la pectina. Previamente se taró un papel filtro en un vidrio de reloj, el papel filtro se transfirió a un embudo de porcelana y se filtró la pectina a vacío, se lavó con 2 porciones de 5mL de etanol-amoniaco para neutralizar el ácido que quedó en la pectina. El filtro se trasladó nuevamente al vidrio de reloj y se secó en la estufa a 60 °C por 24 h. Transcurrido ese tiempo se colocó en un desecador hasta tomar temperatura ambiente y se pesó en una balanza analítica.

% pectina =

$$\frac{w_{\text{papel filtro, vidrio reloj, muestra seca}} - w_{\text{del papel filtro, vidrio reloj}}}{\text{gramos de muestra}} \times 100$$

5.2 Selección de cepas

A continuación se describe la metodología empleada para la selección del microorganismo con la capacidad de crecer en medio de cultivo adicionado con elagitaninos de cáscara de granda y otros sustratos empleados como controles, en la etapa preliminar se presenta un ensayo en microcosmos y en la siguiente el crecimiento sobre placa.

5.2.1 Microorganismos

Se emplearon las cepas de *Aspergillus niger* GH1 y PSH de la colección de Departamento de Investigación en Alimentos (DIA) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila. Estas cepas fueron aisladas y caracterizadas por Cruz-Hernández *et al.* (2005) y se caracterizan por crecer en altas concentraciones de taninos.

5.2.2 Propagación de los microorganismos

Los hongos utilizados en este trabajo se propagaron en medio Pontecorvo recomendado por la American Type Culture Collection (por sus siglas en inglés ATCC) para *Aspergillus niger* (Tabla 10), con 20 gL⁻¹ de agar agar, se ajustó el pH a 6.2 con NaOH 2 M o HCl 2 M. Se usaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo, se inoculó con 200 µL de solución de esporas, se incubó a 30 °C por 7 d.

5.2.3 Determinación preliminar de crecimiento en microcosmos

Se emplearon botellas serológicas de 10 mL con 2 mL de medio de cultivo Pontecorvo como en 5.2.2 (tabla 10). Las cepas se inocularon por picadura al centro de la botella. Los cultivos se incubaron a 30 °C en una cámara con humedad relativa de 70 %. Las fuentes de carbono empleadas fueron: glucosa (G), elagitaninos de *Larrea tridentata* (LT) elagitaninos de cáscara de granada *Púnica granatum* (PG), ácido tánico (AT), ácido elágico comercial (AE), a concentración de 10 gL⁻¹, y dos controles: i), medio de cultivo Pontecorvo sin fuente de carbono y sin extracto de levadura (PC/sL) y ii) medio Pontecorvo con extracto de levadura (PC/L).

5.2.4 Evaluación de la velocidad de crecimiento de las cepas

Se emplearon placas de Petri desechables de 9 cm de diámetro con 20 mL de medio de cultivo. Se inoculó por picadura al centro de la placa. Después de 120 h de

incubación a 30 °C se midió el crecimiento radial en cuatro puntos cardinales de las cajas de Petri cada 24 h. La velocidad de crecimiento radial (v) se estimó como la pendiente de la función del radio de la colonia en función del tiempo y se expresó en mmh⁻¹.

Tabla 10. Composición de los medios Pontecorvo para *Aspergillus* (ATCC).

ATCC medio 687	ATCC medio 950 con 0.05 % extracto de levadura
	0.05 % extracto de levadura
	<i>ATCC Medio 687:</i>
NaNO ₃ 6.0 g	NaNO ₃ 6.0 g
KH ₂ PO ₄ 1.52 g	KH ₂ PO ₄ 1.52 g
KCl..... 0.52 g	KCl..... 0.52 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.52 g	MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.52 g
ZnSO ₄ 0.001 g	ZnSO ₄ 0.001 g
FeCl ₃ 0.85 mg	FeCl ₃ 0.85 mg
Glucosa..... 30.0 g	Glucosa 30.0 g
Metales traza (ver abajo)..... 1.0 ml	Metales traza (ver a bajo)..... 1.0 ml
Biotin*..... 40.0 mcg	Biotin*..... 40.0 mcg
Agua destilada..... 1.0 L	Agua destilada..... 1.0 L
Autoclave a 121 °C por 15 minutos.	Autoclave a 121 °C por 15 minutos.
Ajuste pH a 6.2 con KOH.	Ajuste pH a 6.2 con KOH.
<i>Metales traza:</i>	<i>Metales traza:</i>
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O 100.0 mg	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O 100.0 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O 50.0 mg	MnCl ₂ · 4H ₂ O 50.0 mg
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O..... 50.0 mg	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O..... 50.0 mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O 250.0 mg	CuSO ₄ · 5H ₂ O 250.0 mg
Água destilada..... 1.0 L	Agua destilada..... 1.0 L

5.3 Producción de ácido elálgico por *Aspergillus niger* GH1 en cultivo en medio sólido

En esta sección se presenta la metodología referente a la producción de ácido elálgico en cultivo en medio sólido (CMS), utilizando la cáscara de granada en polvo como soporte y sustrato, se describen las técnicas empleadas para la evaluación y cuantificación de las variables del experimento. También se presenta la producción de ácido elálgico utilizando extracto de cáscara de granada como fuente de carbono y energía y espuma de poliuretano como soporte del CMS.

5.3.1 Uso de polvo de cáscara de granada como soporte y fuente de nutrientes

El experimento se llevó a cabo en cajas de Petri desechables de 9 cm de diámetro con 3 g de polvo de cáscara de granada. Se adicionaron 7 mL de medio Czapek Dox mínimo (NaNO_3 7.65, KH_2PO_4 3.04, MgSO_4 1.52 y KCl 1.52 gL^{-1}), para tener una humedad aproximada del 70 % y pH inicial de 5. Se inocularon con 2×10^7 esporas por gramo de soporte. Las condiciones del cultivo fueron: temperatura de 30 °C, un periodo de cultivo de 6 d, con tiempos de muestreo cada 24 h.

Las variables de respuesta evaluadas fueron pH, (método potenciométrico), azúcares totales (Dubois *et al.*, 1956), fenoles totales (Makkar *et al.*, 1993), ácido elálgico (HPLC), humedad (gravimetría), A_w , (equipo aquaLab), biomasa (gravimetría), actividad tanasa (Sharma *et al.*, 2000) y actividad elagitanasa (propuesta en este experimento).

Para el experimento se prepararon 6 cajas de Petri por cada tiempo de muestreo. Las cajas se distribuyeron de la siguiente manera:

3 cajas para extracto acuoso (pH, azúcares totales, actividades enzimáticas y ácido elálgico).

3 para determinación de humedad y biomasa.

5.3.1.1 Tratamiento de las muestras.

Cada muestra fue sometida a un pre-tratamiento en una campana en condiciones de asepsia. El medio de cultivo sólido con los diferentes tiempos de incubación se colocó en un vaso de precipitados 500 mL, se añadieron 20 mL de agua y se homogenizó por un minuto con una mezcladora de inmersión (Immersion blender, modelo IB901 MX, marca RIVAL). El material homogenizado se transfirió a tubos cónicos de 50 mL y se sometieron a vibración sónica por 30 min (Ultrasonic cleaner BRANSONIC, modelo 2510R-MTH). De los extractos acuosos se recuperaron alícuotas de 1.5 mL para la determinación de ácido elálgico. Los tubos se centrifugaron a 2500 rpm (Centrífuga Hermle 2231_{MKII}, Labnet, Nacional Labnet Company), se decantaron y el sobrenadante se filtró por papel Whatman 41, después por papel filtro de fibra de vidrio. Esta metodología fue desarrollada durante este trabajo experimental.

5.3.1.2 Recuperación de ácido elálgico

Las alícuotas obtenidas después de la vibración sónica (1.5 mL) se centrifugaron a 6000 rpm (Centrífuga modelo 5415 D, marca Eppendorf, Brinkmann,

Instruments Inc.) por 30 min, el sobrenadante se descartó, El precipitado se resuspendió en etanol grado HPLC (1.5 mL) y se sometió a vibración sónica por 30 min. Las muestras se filtraron por membranas de 0.45 µm y se analizaron en el equipo de HPLC (Metodología desarrollada en el laboratorio del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila).

5.3.1.3 Determinación de actividad de agua (Aw)

Se realizó en equipo Aqualab series 3, marca Decagon Devices, Inc. Se colocaron 0.5g del material fermentado en la cuba de muestreo y se introdujo dentro de la cámara del equipo, se cerró la cámara y se inicio el ciclo. Se registró la actividad de agua de la muestra.

5.3.1.4 Determinación del pH

Ver sección 5.1.3.7

5.3.1.5 Cuantificación de ácido eláxico por cromatografía de líquidos

El ácido eláxico se cuantificó en un equipo cromatográfico de HPLC (Varian Pro Star 3300, Palo Alto, CA, USA) usando un detector de arreglo de fotodiodos (PDA Pro Star 330) a 254 nm. La separación se llevó a cabo con una columna Prodigy ODS (5 µm; 250×4.6 mm, Phenomenex) a temperatura de 30 °C, usando un gradiente. Las fases móviles consistieron en acetonitrilo (solvente A) y ácido acético al 0.3 % (v/v) (solvente B), 7–20 % A (0–7 min), 20–30 % A (7–12 min), 30 % A (12–18 min), 30–60 % A (18–20 min), 60–100 % A (20–23 min), 100 % A (23–30 min), 7 % A (30–31 min), y 7 min de equilibrio para estabilizar la columna, un flujo de 0.7mLmin⁻¹ con un volumen de inyección de 10 µl.

5.3.1.6 Parámetros cinéticos asociados al crecimiento microbiano

La tasa específica de crecimiento μ , fue evaluada mediante la ecuación logística de Velhurst-Pearl (Gatto *et al.*, 1998; Viniegra-González *et al.*, 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M \left[1 - \frac{X}{X_{\max}} \right] X \quad (1)$$

donde X es la biomasa (g por L, por cm² ó por kg), μ_M es la velocidad máxima de crecimiento específico (h⁻¹) y X_{\max} es el valor de equilibrio para X donde $dX/dt = 0$, para $X > 0$. La solución de la ecuación anterior es la siguiente:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left(\frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right) e^{-\mu_M t}} \quad (2)$$

donde X_0 es la condición inicial para X . La ecuación 6 sirve para ajustar los datos experimentales de la ecuación 11, minimizando la suma de errores al cuadrado como función de los parámetros X_0 , X_{\max} y μ_M .

La productividad (P) fue estimada dividiendo la concentración final de ácido elálgico entre el tiempo de cultivo y expresada como $\text{mgAE/gS}^{-1}\text{día}^{-1}$.

Se calculó el rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) que es la cantidad de biomasa producida por gramo de sustrato utilizado, así como también el rendimiento de producto/biomasa ($Y_{P/X}$) que es la cantidad de metabolito que se forma por cada gramo de biomasa que se produce. El cálculo se determinó en las fórmulas 3 y 4:

$$Y_{X/S} = \frac{X_2 - X_1}{S_1 - S_2} \quad (3) \quad \text{y} \quad Y_{P/X} = \frac{P_2 - P_1}{X_1 - X_2} \quad (4)$$

respectivamente. Donde:

X_1 = Concentración inicial de biomasa, X_2 = Concentración de biomasa en el tiempo en el que se obtiene la mayor concentración de producto, S_1 = Concentración inicial de sustrato, S_2 = Concentración de sustrato en el tiempo en el que se obtiene la mayor concentración de producto, P_1 = Concentración inicial de producto y P_2 = Concentración máxima de producto.

Con estos parámetros, se calculó la tasa específica de consumo de sustrato (q_s):

$$q_s = \mu/Y_{X/S} \quad (5)$$

Así como la tasa específica de formación de producto (q_p):

$$q_p = \mu Y_{P/S} \quad (6)$$

El consumo de sustrato fue modelado empleando una expresión de dos términos propuesta por Pirt [Viniestra-González et al., 2003; Pirt. 1975]:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dX}{dt} + mX \quad (7)$$

donde S es la concentración de sustrato (g por L, por cm^2 ó por kg), $Y_{X/S}$ el rendimiento de biomasa y m el coeficiente de mantenimiento ($\text{gSgX}^{-1}\text{h}^{-1}$). La solución de la ecuación 8 puede ser obtenida en función de X de la siguiente manera:

$$S(t) = S_0 - \left(\frac{X - X_0}{Y_{X/S}} \right) - \left(\frac{X_{\max} * m}{\mu} \right) \ln \left[\frac{X_{\max} - X_0}{X_{\max} - X} \right] \quad (8)$$

donde S_0 es la condición inicial para el nivel de sustrato S . La ecuación 8 nos ayuda a probar la importancia del coeficiente de mantenimiento m , debido a que una gráfica de $S(t)$ vs. $X(t)$ generaría una línea recta con una pendiente de $1/Y_{X/S}$, siempre y cuando m sea insignificante.

La cinética de formación de producto fue modelada empleando la ecuación de Luedeking y Piret (Viniegra-González *et al.*, 2003; Luedeking *et al.*, 1959) que se muestra a continuación:

$$\frac{dP}{dt} = Y_{P/X} \frac{dX}{dt} + kX \quad (9)$$

donde P es la concentración de producto, $Y_{P/X}$ el rendimiento de producto en términos de biomasa (unidades de producto por unidades de biomasa) y k el coeficiente secundario de formación o destrucción de producto. La ecuación 9 es similar a la ecuación 10, pero en ésta, el coeficiente k puede ser negativo, cero o positivo, debido a que la formación o destrucción no está necesariamente relacionada al crecimiento. La solución de la ecuación 9 en función de la biomasa es:

$$P(t) = P_0 + Y_{P/X} (X - X_0) + \frac{kX_M}{\mu_M} \ln \left[\frac{X_M - X_0}{X_M - X} \right] \quad (10)$$

5.3.2 Uso de extracto de cáscara de granada como fuente de carbono y energía y espuma de poliuretano como soporte sólido

La cáscara de granada es una buena fuente de elagitaninos, sin embargo, para obtener extracto enzimático sin tantas impurezas, empleando el extracto de cáscara de granada y como soporte del cultivo espuma de poliuretano, para este experimento se utilizó la metodología que se describe a continuación.

5.3.2.1 Obtención del extracto de cáscara de granada

Se preparó una suspensión de cáscara de granada en polvo y agua en una relación 1: 5 m/v (1400 g de cáscara con 7000 mL de agua). Se agitó por 5 h, una vez que transcurrió el tiempo el extracto se filtró a través de tela muselina, posteriormente, por fibra de vidrio del No. 4 Whatman y por papel filtro No. 40 Whatman, el extracto se mantuvo en refrigeración hasta antes de su empleo.

5.3.2.2 Cultivo en medio sólido con espuma de poliuretano

El experimento se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL a los cuales se les colocaron 3 g de PUF, previamente lavada en agua destilada caliente dos veces y enjuagada en agua fría dos veces, secada en estufa a 40°C por el tiempo necesario (2-4 d), y se le adicionaron 7 mL de extracto de cáscara de granada conteniendo las sales del medio Czapek dox mínimo (*ver 5.3.1*) para tener la humedad al 70 %, se inocularon 2×10^7 esporas por gramo de PUF, las condiciones del cultivo fueron, temperatura de 30 °C, un periodo de cultivo de 72 h, con tiempos de muestreo cada 12 h.

A cada tiempo de cultivo se tomaron los matraces y se les adicionó 20 mL de solución amortiguadora de citratos (50 mM, pH 5), el material se colocó en una jeringa de 50 mL, la cual contenía un filtro Whatman 41 en su base, se sometió a presión y se obtuvo el extracto crudo, el cual, se dividió en dos fracciones de 10 mL. La primera fracción se empleó para determinar las siguientes variables de respuesta, azúcares totales (*ver 5.1.3.8*), fenoles totales (*ver 5.1.3.9*), ácido elágico por HPLC (*ver 5.1.2.2*) y la actividad elagitanasa. (*ver 5.3.4*). La segunda fracción se colocó en frascos de boca ancha, la tapa fue horadada y se le colocó una membrana de celulosa de 12000 Da (Sigma, dialysis tubing D-9277) y se sometió a diálisis usando solución amortiguadora de citratos 50 mM pH 5, manteniéndose en refrigeración (4-8 °C) cambiando el líquido cada 8 h hasta obtener un extracto transparente. Finalmente, se filtró por membrana de 0.45 µm.

5.3.3 Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se llevó a cabo mediante la técnica reportada por Bradford (1976), para la cual se empleó albúmina sérica bovina (100 ppm solución madre) y el reactivo de Bradford. Para la determinación se colocó 1.0 mL de muestra (dilución 1:10) con 1.0 mL del reactivo de Bradford, los tubos se agitaron y se dejaron reposar por cinco minutos, transcurrido el tiempo de reacción se registró la Absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

5.3.4 Evaluación preliminar de la actividad elagitanasa

Para determinar la actividad elagitanasa se probaron diferentes metodologías reportadas en la literatura para enzimas degradadoras de taninos, como la técnica de Sharma *et al.* (2002) y la técnica de Beverini y Metche (1990).

5.3.4.1 Obtención del sustrato para evaluar la actividad enzimática

Para esta determinación es necesario tener un sustrato para la actividad enzimática, por lo cual se preparó una suspensión de cáscara de granada como se mencionó en la sección 5.3.2.1, posteriormente se hicieron pasar fracciones de 20 mL a través de una columna empacada con amberlita XAD- 16, usada para la concentración de polifenoles (Seeram *et al.*, 2005).

Se realizaron lavados de la columna con agua para la eliminación de compuestos hidrosolubles, posteriormente se llevó a cabo la elusión de los polifenoles con etanol de alta pureza. Se eliminó el solvente en un rotavapor, elagitaninos totales de púnica (ETP); la cual fue pulverizada con un mortero y usada como sustrato para la determinación de la actividad enzimática.

5.3.4.2 Técnica para la determinación de la actividad elagitanasa

La técnica consistió en una modificación a la propuesta por Beverini y Metche (1990) para otra enzima degradadora de taninos y se realizó como sigue:

Se preparó una solución de elagitaninos totales de cáscara de granada (1 mgmL^{-1}) en solución amortiguadora de citratos (0.05 M, pH 5), como sustrato para determinar la actividad degradadora de elagitaninos.

Se pre-incubaron todos los reactivos a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Se colocó 1 mL de la solución de sustrato en un tubo de prueba y otro control. Se añadieron $50 \text{ }\mu\text{L}$ de la solución de enzima en el tubo prueba y se incubaron a 30°C por 120 min, inmediatamente después se añadieron $200 \text{ }\mu\text{L}$ de HCl (2 M). Se recuperó el ácido elálgico (*ver* 4.3.1.2), se filtró por membranas de $0.45 \text{ }\mu$, se recolectó en viales de 2 mL y se determinó el ácido elálgico por HPLC (*ver* 4.3.1.5). En la tabla 11, se resume lo anterior.

Tabla 11. Condiciones preliminares de la actividad elagitanasa.

Muestra	Control
Sustrato ETP 1 mL (1 mgmL^{-1}).	Sustrato ETP 1 mL (1mg/mL).
Extracto enzimático 50 μL .	Incubación a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 min.
Incubación a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 120 min	HCl 2 M, 200 μL .
HCl 2 M 200 μL .	Extracto enzimático 50 μL .

La definición de la actividad enzimática es la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de ácido elálgico por minuto.

$$\frac{g}{L} = \left[\frac{vol_ensayo}{vol_EE} \right] \left[\frac{1molAE}{302.0g} \right] \left[\frac{10^6 \mu molAE}{1molAE} \right] \left[\frac{1}{t} \right] = \left[\frac{mmolEA}{LE * min} \right] = \frac{U}{L}$$

5.3.5 Purificación de la elagitanasa

Se empleó un sistema de purificación de proteínas denominado cromatografía líquida rápida de proteínas (Fast protein liquid chromatography por sus siglas en inglés (FPLC)) (Akta prime, modelo 1330).

5.3.5.1 Cromatografía de permeación en gel

Se empleó una columna Sephadex™ G-25 (GE, modelo Hitrap™ desalting), de 5 mL de capacidad, bajo las condiciones que se dan en la tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de operación para la columna G-25.

Condición	Unidad
Presión	1 Mpa
Flujo	1 mLmin ⁻¹
Volumen de equilibrio	10 mL
Volumen de elución	15 mL
Volumen de muestra	1.4 mL
Volumen de fracción	2. mL

Se obtuvieron 8 tubos con fracciones de 2 mL cada uno. En cada tubo se analizó la actividad enzimática elagitanasa y el ácido elágico.

5.3.5.2 Cromatografía de intercambio iónico

Para la cromatografía de intercambio iónico se usó una columna empacada de Sepharosa (GE, modelo Hitrap™ QXL) de 1 mL de capacidad, bajo las condiciones de la tabla 13. Se colectaron 40 fracciones y se les analizó el contenido de ácido elágico y actividad elagitanasa.

Tabla 13. Condiciones de operación para la columna QXL.

Condición	Unidad
Presión	1 Mpa
Flujo	1 mLmin ⁻¹
Volumen de equilibrio	15 mL
Volumen de elución	40 mL
Volumen de muestra	2.0 mL
Volumen de fracción	1.0 mL
Primero y segundo lavado	10 mL

5.3.5.3 Cromatografía de separación de la actividad elagitanasa en geles de poliacrilamida

Las fracciones con actividad elagitanasa se separaron en geles de poliacrilamida para la evaluación de la pureza de proteína de interés, bajo la siguiente composición.

Tabla 14. Composición del gel de poliacrilamida de concentración 4x.

Componente	Cantidad
Buffer de concentración 4 X	1.25 mL
Agua	3.0 mL
Acilamida	0.75 mL
10 % APS*	100 µL
TEMED**	10 µL

* Persulfato de amonio,

**N,N,N,N tetrametiletilendiamina.

Tabla 15. Composición del gel de poliacrilamida de resolución 4x.

Componente	Cantidad
Buffer de resolución 4 X	2.5 mL
Agua	3.5 mL
Acilamida	4 mL
10 % APS*	150 µL
TEMED**	5 µL

* Persulfato de amonio,

**N,N,N,N tetrametiletilendiamina.

5.3.5.3.1 Preparación de las muestras para cargar en geles de poliacrilamida

Se preparó una solución con buffer de muestra (Tris-HCl (0.5 M) 0.3 mL (1.5 M); glicerol 0.4 mL; SDS al 10 %; 0.8 mL; β-mercaptoetanol 0.2 mL; agua desionizada 2.1 mL)

Se tomaron 185 µL de buffer de muestra y 100 µL de azul de bromofenol, se tomaron 20 µL de esta solución y se mezclaron con 20 µL de extracto enzimático, se colocaron en un baño a ebullición por 5 minutos. Se colocaron las muestras en los carriles del gel de poliacrilamida y éste se colocó en la cámara de electroforesis, se llenó con el buffer de corrida y se sometió a una corriente eléctrica de 60 V.

5.3.5.3.2 Tinción con plata (Switzer, 1979)

Los geles se lavaron con agua desionizada y se colocaron en recipientes individuales, donde se adicionaron las soluciones de la tabla 16. Después de teñir los geles se colocaron en papel celofán y se tomaron fotografías.

Tabla 16. Tinción plata (Switzer, 1979).

Solución	Componentes	Tiempo
I	Metanol (25 mL), ácido acético (6 mL), formaldehído (50 µL) y aforar a 100 mL con agua.	Lavar por 2 horas en agitación constante.
II	Etanol	Lavar 3 veces por 20 min cada vez.
III	Tiosulfato de sodio 0.5 g en 150 mL de agua.	Lavar los geles 3 veces con agua desionizada cada 20 seg.
IV	AgNO ₃ (0.2 g), formaldehído (150 µL) y 100 mL de agua desionizada	15 min y después lavar con agua desionizada por 20 seg.
V	NaCO ₃ (6 g), formaldehído (200 µL) y 100 mL de agua desionizada.	Dejar la reacción hasta que aparezcan bandas
VI	Metanol (50 ml), ácido acético (6 ml), formaldehído (100 µL) y 38 mL de agua desionizada	Detener la reacción

5.4 Producción a mayor escala de la enzima elagitanasa por cultivo en medio sólido y su purificación

En esta etapa se condujo el experimento con mayor volumen de muestra para obtener un volumen mayor de extracto enzimático, empleando las condiciones previamente obtenidas.

5.4.1 Condiciones de cultivo

La fermentación se llevó a cabo en un reactor de charola (plástico) de 29.0 x 24.5 x 5.5 cm) donde se mezclaron el extracto de cáscara de granada (3.040 mL) con las sales del medio Czapek (*ver* 5.3.1), ajustando las cantidades de acuerdo al volumen de extracto y espuma de poliuretano en polvo (130 g), se inoculó con *Aspergillus niger* GH-1 a un nivel de 2×10^7 esporas por gramo de poliuretano. Se mezclaron los componentes para obtener una distribución homogénea y se llevó a incubar a 30°C por 44 h.

5.4.2 Obtención del extracto enzimático

Una vez que transcurrió el tiempo de cultivo al material fermentado se le adicionó buffer de citratos 50 mM pH 5 (867 mL) y se prensó manualmente para la obtención del extracto de fermentación, después se filtró por tela muselina de poro cerrado para la eliminación de partículas sólidas de mayor tamaño, posteriormente se filtro a través de papel filtro Whatman 41.

Durante las etapas de la purificación se determinó la concentración de proteínas (ver 5.3.3), la actividad enzimática elagitanasa (ver 5.3.4.) y se realizaron geles de poliacrilamida (ver 5.3.5.3) para evidenciar el grado de purificación.

5.4.3 Purificación del extracto enzimático

El extracto obtenido del cultivo a mayor escala se sometió a las siguientes etapas de purificación:

5.4.3.1 Diálisis del extracto enzimático

El extracto enzimático se dividió en fracciones de 500 mL y cada una se colocó en una membrana de celulosa de 12000 Da y se puso a dializar en buffer de citratos 50 mM pH 5 manteniéndose en refrigeración. El búfer se cambió cada 12 h durante 3 d hasta que el extracto enzimático tuviera una apariencia transparente, después de esto el extracto se filtró por membrana de 0.45 μm .

5.4.3.2 Ultrafiltración del extracto enzimático

El extracto enzimático se filtro a través de un equipo de ultrafiltración (Marca, Watson Marlon y un modulo Quix Stand Benchtop system) usando una columna (Amersham Biosciences de 140 cm^2 , NMWC a 60 rpm) de 30 kDa, se ultrafiltraron 1000 mL de extracto enzimático colectándose el material permeado y el concentrado.

5.5 Caracterización físico-química de la enzima elagitanasa

En primera instancia se optimizó el método para la cuantificación de enzima elagitanasa y posteriormente se evaluó el efecto del pH y la temperatura sobre la actividad elagitanasa.

5.5.1 Pruebas sobre la actividad enzimática bajo diferentes condiciones de reacción

Se realizaron cuatro experimentos para determinar las mejores condiciones de ensayo de la actividad enzimática.

5.5.1.1 Evaluación de la concentración de ácido clorhídrico sobre los ETP

Para la evaluación de la influencia de la concentración de HCl sobre la desnaturalización del sustrato se realizó el ensayo de actividad elagitanasa sin usar el extracto enzimático, utilizando diferentes concentraciones de ácido (0.5, 1.0 1.5 y 2.0 M),

5.5.1.2 Efecto de la concentración de sustrato en la determinación de la actividad enzimática

Se determinaron las curvas de velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato (de 0 a 5 mgmL⁻¹ de elagitaninos totales de cáscara de granada) y del tiempo (hasta 120 min).

5.5.1.3 Efecto del pH sobre la determinación de la actividad enzimática

Después de obtener el tiempo de reacción en el que se realiza la hidrólisis a velocidad constante, se evaluó el efecto del pH (de 3 a 7) sobre la actividad enzimática.

5.5.1.4 Efecto de la temperatura sobre la determinación de la actividad enzimática

Una vez evaluado el pH se procedió a evaluar el efecto de la temperatura (de 20 a 60 °C) sobre la actividad elagitanasa.



6. Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos durante este proyecto se presentan de acuerdo a las etapas experimentales presentadas en la sección de metodología experimental.

- a) Resultados de la obtención del material vegetal, preparación de la muestra para análisis y cuantificación de elagitaninos.
- b) Capacidad de las cepas fúngicas de emplear los elagitaninos como sustrato y seleccionar la cepa a utilizar.
- c) Producción de ácido elágico y de la enzima elagitanasa.
- d) Desarrollo de la metodología para la evaluación de la actividad elagitanasa.
- e) Purificación del extracto enzimático obtenido por CMS e identificación la enzima responsable de la degradación de elagitaninos, y
- f) Caracterización físico-química de la enzima responsable de la degradación de elagitaninos.

6.1 Cuantificación de elagitaninos, obtención del material vegetal y reducción del tamaño de partícula

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la cuantificación de elagitaninos como equivalentes de ácido elágico en las cinco especies de plantas estudiados, así como, el rendimiento del lote de frutos de granada, hasta obtener la cáscara de granada en polvo, así como la caracterización físico-química de la cáscara.

6.1.1 Cuantificación de ácido elágico de los materiales vegetales

La tabla 17 presenta los resultados de la cuantificación de elagitaninos en tallos de *Jatropha dioica* (Sangre de Drago), tallos de *Euphorbia antisyphylitica* (Candelilla), Hojas de *Flourensia cernua* Cov. (Hojasén) y cáscara de granada (*Punica granatum* L.), en estado intermedio de maduración y cáscara de frutos maduros. En todas las muestras se encontró la presencia de elagitaninos. La cáscara de granada mostró una mayor concentración de elagitaninos como equivalentes de ácido elágico (33.7mgg^{-1} de cáscara en polvo) con respecto a las demás fuentes (Tabla 17). Al respecto, existen reportes sobre la presencia de elagitaninos en diferentes especies de *Euphorbiaceae*, de las cuales *Euphorbia acaulis* posee un

derivado de ácido elágico, sustituido en tres de sus hidroxilos por grupos metilo (Birda *et al.*, 1998); también el elagitanino jolkinina fue encontrado en *Euphorbia Jokinii* (Lee *et al.*, 2004). El presente estudio es el primer reporte de cuantificación de ácido elágico en *Euphorbia antisiphilitica* (2.18 mg de ácido elágico por gramo de ramas de tallos libres de cera en polvo). Para el resto de los materiales evaluados (*Jatropha dioica*, *Flourensia cernua* Cov. y *Larrea tridentata*) éste es el primer reporte sobre la presencia de elagitaninos (apéndice B).

Los resultados encontrados para cáscara de granada concuerdan con los reportados por diferentes autores (Seeram *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2002 y Akiyama *et al.*, 2001). Estos resultados se discuten más adelante ya que, por contener una cantidad considerable de elagitaninos, la cáscara de granada fue seleccionada como material vegetal para continuar con el proyecto, sin dejar de lado otras fuentes potenciales (Apéndice B).

Tabla 17. Contenido de ácido elágico en diferentes fuentes vegetales.

Fuente vegetal		Ácido elágico (mg g ⁻¹) ^{a,b}
Nombre común	Nombre científico	
Cáscara de granada	<i>Punica grantum</i> estado intermedio	33.79 ± 7.43
Cáscara de granada	<i>Punica granatum</i> madura	12.80 ± 5.83
Candelilla	<i>Euphorbia antisiphylitica</i>	2.18 ± 0.39
Gobernadora	<i>Larrea tridentata</i>	2.5±0.72
Hojasén	<i>Flourensia cernua</i>	1.59 ± 0.96
Sangre de Drago	<i>Jatropha dioica</i>	0.81 ± 0.43

^a el valor de la media de *n* número de repeticiones.(*n*=3)
^b base seca

6.1.2 Procesamiento del materiales vegetal seleccionado

Debido a que la cáscara de granada fue el material vegetal con mayor contenido de elagitaninos se procedió a evaluar su rendimiento en frutos de granada y su caracterización físico-química.

6.1.2.1 Procesamiento de cáscara de granada (*Punica granatum* L.)

El procesamiento de los frutos de granada generó 13 % de cáscara como subproducto (Tabla 18). El principal aprovechamiento de este fruto es para la producción del jugo concentrado y producto en fresco. La producción mundial de granada es de 957,142.86 ton anuales (Iran-daily, 2004). Más del 60 % se

industrializa, generando 574,285.7 ton de residuos al año. En México se producen 3,726.57 ton al año (SIACON, 2006), las cuales generan alrededor de 500.0 ton de residuos por año. La cáscara de granada como residuo representa una fuente potencial de compuestos bioactivos, en particular de elagitaninos que no son aprovechados.

Tabla 18. Rendimiento del procesamiento de frutos de granada.

Componentes	(gKg ⁻¹)	Rendimiento %
Cáscara	130.7±0.97	13.07
Semilla	124.2±4.41	12.42
Humedad	682.1±3.33	68.21

6.1.2.2 Caracterización físico química de la cáscara de granada

La caracterización físico-química del polvo de cáscara de granada (análisis bromatológico) muestra que es un residuo con buenas características para ser utilizado como soporte y sustrato en CMS. En cuanto al contenido de azúcares solubles representan el 20 %, otra fuente de carbono la representan los aceites con 3.5 % (Tabla 19). Es evidente la baja concentración de nitrógeno, sin embargo, éste puede ser adicionado al medio de cultivo para obtener buenos rendimientos de biomasa. No existen reportes en la literatura sobre la caracterización de cáscara de granada, por tal motivo no tenemos punto de comparación.

Robledo-Olivo (2007) llevó a cabo un estudio sobre la capacidad del polvo de cáscara de granada para ser empleado como soporte en medio sólido, encontrando que tiene un índice de absorción de agua (IAA) de 4.8g por gramo de polvo de cáscara de granada, aproximadamente cinco veces su peso original, lo cual permite manipular el contenido de agua durante el cultivo en medio sólido.

Tabla 19. Caracterización físico-química de cáscara de granada.

Componente	Cáscara (g)
Humedad	5.5 ± 1.25
Materia seca	94.45 ± 1.25
Ceniza	3.59 ± 0.08
Extracto etéreo	3.57 ± 0.38
Proteína	1.26 ± 0.17
Fibra cruda	17.75 ± 1.61
Pectina	10.12±1.83
Azúcares solubles	20.42 ± 0.62
Polifenoles totales	9.3 ± .001
Otros*	28.0±0.5

* vitaminas, minerales, pigmentos, gomas, mucílago, protopectinas, etc.

6.1.2.3 Perfil de polifenoles en la cáscara de granada

Los resultados del perfil de polifenoles se calcularon para un kilogramo de material vegetal en polvo (Tabla 20). A partir del 9.3 % de polifenoles totales se obtiene el 5.9 % de taninos hidrolizables, de los cuales el 5.3 % son elagitaninos.

Los resultados son mayores con respecto a lo reportado para polifenoles totales de cáscara de granada madura por Robledo-Olivo (2007), quien reportó 6.1 % de polifenoles totales. Hyder *et al.* (2005) reportan 4.6 % para hojas de planta de gobernadora en base seca, sin embargo, mencionan que la concentración de polifenoles y otros componentes disminuye o se incrementa de acuerdo a las condiciones climáticas, estaciones, tipo de suelo, altura sobre el nivel del mar e inclusive la invasión de plagas entre otros factores.

Los resultados del contenido de elagitaninos arrojaron un valor de 53 g por Kg de cáscara de granada en polvo, lo que concuerda con lo reportado por Seeram *et al.* (2005) en donde obtienen de 50–52 g de elagitaninos por Kg de cáscara de granada. Lo mismo ocurre al comparar con lo reportado para granada en diferentes estadios de maduración de (*Punica granatum*). Ascacio (2007) reporta valores de 61.1, 83.2, 85.8 gKg⁻¹ para granada no madura (verde), estado intermedio (moteada) y madura (roja) respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo son superiores a los reportados para elagitaninos de bayas como frambuesas (*Rubus idaeus*) de 0.708 gKg⁻¹ (Hakkinen *et al.*, 2000), 0.244 gKg⁻¹ (De Ancos *et al.*, 2000), 3.3 gKg⁻¹ (Kaponen *et al.*, 2007).

Tabla 20. Composición de polifenoles en la cáscara de granada

Cáscara de granada en polvo		
Componente	g	%
Polifenoles totales	93.0±0.11	9.3
Desglose de polifenoles totales		
Taninos condensados ⁺	34.0±0.0	3.4
Taninos hidrolizables	59.0±4.0	5.9
Desglose de taninos hidrolizables		
Galotaninos ⁺	6.0±0.0	0.6
Elagitaninos	53.0±2.1	5.3

*humedad, azúcares, celulosa, lignina, minerales, proteínas etc.
+valores calculados.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten establecer que el polvo de cáscara de granada es una excelente fuente de elagitaninos y tiene las características para ser empleado como soporte y fuente de sustrato para los estudios

de producción de elagitanasas. Para ello, se procedió a los estudios de selección del microorganismo capaz de producir las enzimas degradadoras de elagitaninos.

6.2 Evaluación de cáscara de granada como sustrato para el crecimiento de hongos en CMS

La cáscara de granada en polvo y los polifenoles totales de gobernadora (*Larrea tridentata*) fueron evaluados como sustrato para el crecimiento de las cepas de *Aspergillus niger* GH1 y PSH. En esta sección se presentan los resultados de la sección preliminar de crecimiento en microcosmos y en placa.

6.2.1 Estudios de crecimiento en microcosmos

Los resultados obtenidos en las pruebas preliminares demostraron que las dos cepas de *A. niger* (GH1 y PSH) fueron capaces de crecer en el medio Pontecorvo empleando glucosa, ácido tánico y polvo de elagitaninos de cáscara de granada (PG) (Figura 6), lo que demuestra que ambas cepas tienen la capacidad de emplear los elagitaninos de cáscara de granada como fuente de carbono. En el caso del ácido elálgico (AE), se observó un bajo crecimiento de ambas cepas con respecto a los demás sustratos (Figura 6). Este resultado no era esperado, aunque se ha reportado la inhibición de bacterias por el AE (Akiyama *et al.*, 2001; Machado *et al.*, 2002). Por el carácter cualitativo de los resultados obtenidos, se decidió evaluar el crecimiento de ambas cepas en placa, evaluando el crecimiento a partir de ácido elálgico como única fuente de carbono.

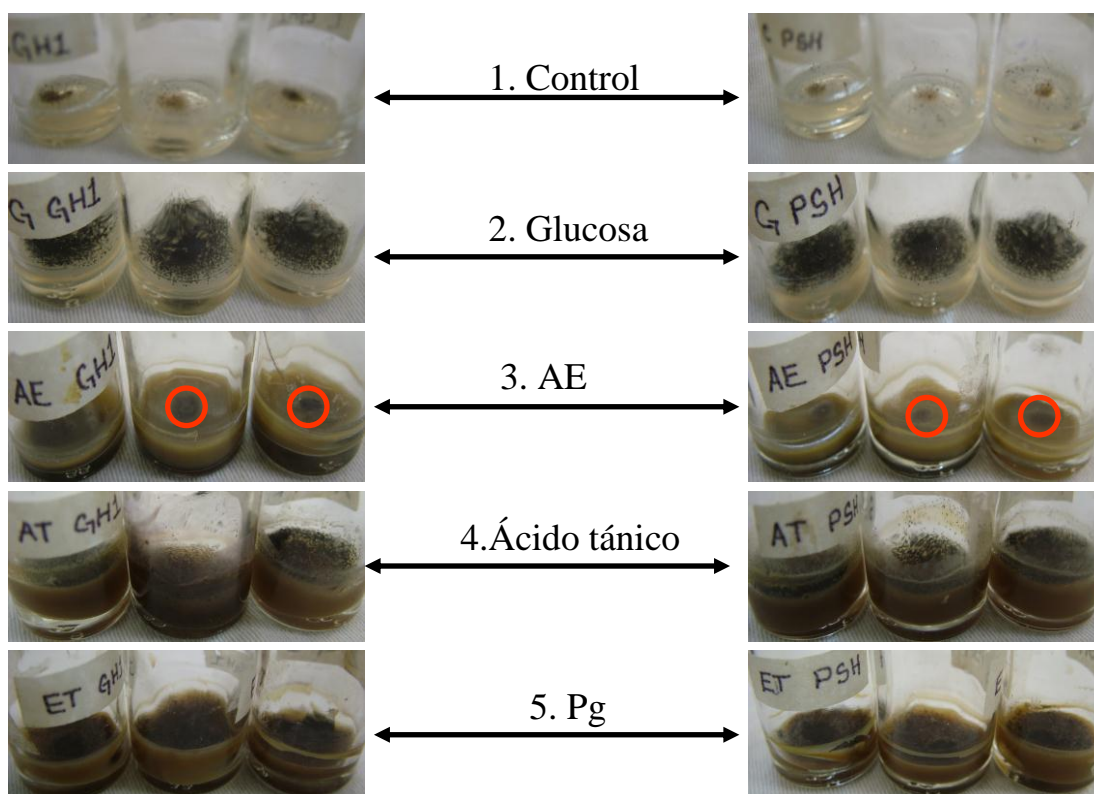


Figura 6. Imágenes del crecimiento en microcosmos de las cepas de *A. niger* GH1 (izquierda) y PSH (derecha), sobre diferentes fuentes, 1) Sin fuente de carbono (PC/L), 2) glucosa (G), 3) Ácido elálgico (AE), 4) Ácido tánico (AT) y 5) Elagitaninos de cáscara de granada de PG.

6.2.2 Estudios de crecimiento en placa

De los diferentes sustratos evaluados por su contenido de elagitaninos para determinar el crecimiento de las cepas de *Aspergillus niger* (PSH y GH1) se obtuvo que las dos cepas fueron capaces de crecer en los medios conteniendo ácido tánico, polifenoles totales de *Larrea* (FTL) y elagitaninos de cáscara de granada (Pg), de forma similar al control con glucosa, sin embargo, los resultados de crecimiento en ácido elálgico fue 7 veces menor para GH1 y 11 veces menor para PSH (Figuras 7 y 8).

Los resultados concuerdan con los obtenidos previamente por Belmares-Cerda (2004), quien utilizó *L. tridentata* para producir la enzima tanasa empleando las cepas *Aspergillus niger* (PSH y GH1) en CMS. Otras cepas como *Aspergillus niger* Aa-20 crecen empleando galotaninos como fuente de carbono en sistemas de cultivo sumergido y sólido (Aguilar *et al.*, 2001b).

Sin embargo, ninguna de las cepas fue capaz de usar eficientemente el ácido elálgico como sustrato bajo las condiciones de ensayo, lo anterior puede deberse a las

propiedades químicas del ácido elálgico por su baja solubilidad en soluciones acuosas (Bala *et al.*, 2005); lo que no permite su dispersión homogénea en el medio y sí, un precipitado en el fondo de la caja de Petri, por lo que el sustrato no está disponible para los microorganismos.

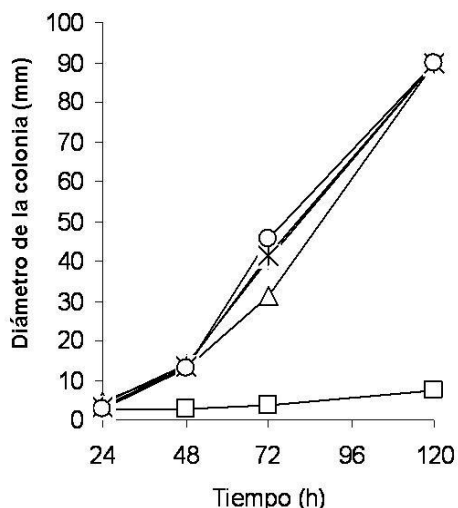


Figura 7. Crecimiento de *A. niger* PSH en diferentes fuentes de carbono. (◇) Glucosa, (□) Ác. elálgico, (Δ) Ac. tánico, (*) FTL, (○) Pg.

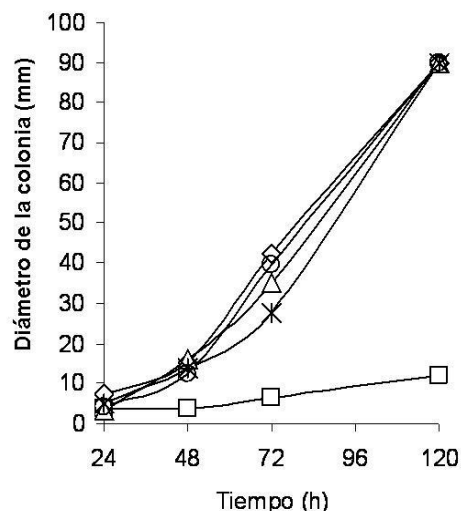


Figura 8. Crecimiento de *A. niger* GH1 en diferentes fuentes de carbono. (◇) Glucosa, (□) Ác. elálgico, (Δ) Ac. tánico, (*) FTL, (○) Pg.

6.2.2.1 Velocidad de crecimiento de las cepas GH1 y PSH sobre diferentes sustratos

La velocidad de crecimiento de las dos cepas en presencia de glucosa como fuente de carbono fue similar ($0.593 \pm 0.0160 \text{ mmh}^{-1}$ PSH y $0.564 \pm 0.0100 \text{ mmh}^{-1}$ GH1). La velocidad de crecimiento en el medio con ácido tánico fue $0.487 \pm 0.0139 \text{ mmh}^{-1}$ (PSH) y $0.435 \pm 0.0424 \text{ mmh}^{-1}$ (GH1). Para el caso de los elagitaninos se obtuvieron para LT $0.385 \pm 0.0349 \text{ mmh}^{-1}$ (PSH) y $0.574 \pm 0.0160 \text{ mmh}^{-1}$ (GH1) y para PG $0.551 \pm 0.1122 \text{ mmh}^{-1}$ (PSH) y $0.634 \pm 0.0424 \text{ mmh}^{-1}$ (GH1). (Tabla 21). Los resultados concuerdan con los reportados por Robledo-Olivo (2007), quien empleó ambas cepas y observó que crecieron de manera favorable en la cáscara de granada, presentando una máxima velocidad de crecimiento de 0.40 mmh^{-1} (GH1) y de 0.41 mmh^{-1} (PSH).

Tabla 21. Velocidades de crecimiento de *A. niger* GH1 y PSH.

Sustrato	<i>Aspergillus niger</i> Velocidad de crecimiento (mmh ⁻¹)	
	GH1	PSH
PC/sL*	0.055±0.0138	0.059±0.0008
PC/L**	0.319±0.0138	0.347±0.0138
Glucosa	0.593±0.0160	0.564±0.0100
Ácido tánico	0.487±0.0139	0.435±0.0424
LT	0.385±0.0349	0.574±0.0160
PG	0.551±0.1122	0.634±0.0424
AE	0.087±0.1603	0.050±0.0080

* PC/sL: Medio Pontecorvo sin extracto de levadura y sin fuente de carbono.

**PC/L: Medio Pontecorvo con extracto de levadura y sin fuente de carbono.

Lt: Polifenoles de gobernadora (*Larrea tridentata*)

PG: Elagitaninos de cáscara de granada (*Punica granatum*)

AE: Ácido elálgico.

Con los resultados obtenidos y considerando que no hubo diferencias al comparar la capacidad de ambas cepas de crecer sobre elagitaninos, se decidió utilizar solo una cepa, se eligió a la cepa GH1.

6.3 Producción de ácido elálgico y enzima elagitanasa por cultivo en medio sólido

En esta sección se presentan los resultados de la producción de ácido elálgico en CMS, utilizando la cáscara de granada como soporte y fuente de sustrato, además, se presentan los resultados de producción de la enzima elagitanasa usando el extracto de cáscara de granada como sustrato en CMS y espuma de poliuretano como soporte.

6.3.1 Producción de ácido elálgico por cultivo en medio sólido

Las imágenes de crecimiento durante el cultivo de la cepa de *A. niger* GH1 a partir de polvo de cáscara de gobernadora se muestra en la figura 9. Se observa que a las 48h de cultivo hay presencia considerable de micelio sin esporular. La esporulación inicia a las 72 h, probablemente debido a la deficiencia de nitrógeno en el medio de cultivo. En la figura 10 se observa que la máxima concentración de biomasa se alcanza entre las 96 h y las 120 h; sin mostrar una diferencia estadística significativa con el valor obtenido a las 144 h.

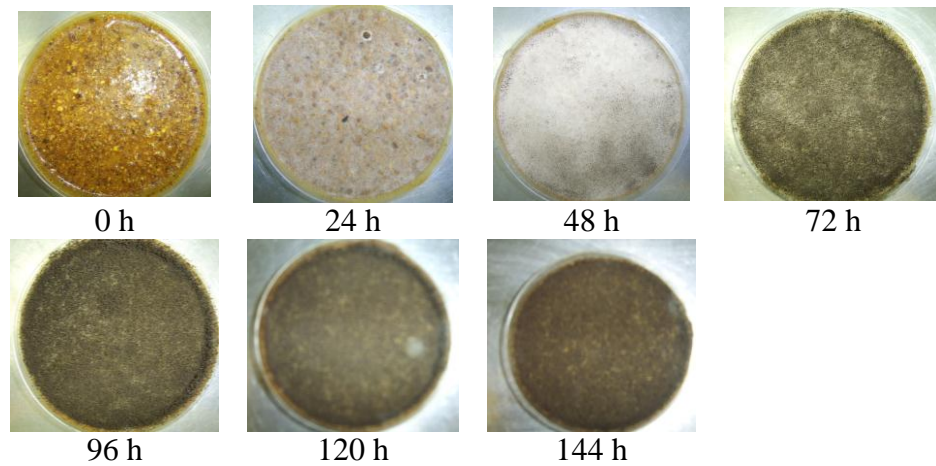


Figura 9. Fotografías de crecimiento de *Aspergillus niger* GH1 sobre cáscara de granada en polvo.

El rápido incremento de micelio en las primeras 24 y 48 h de cultivo, se debe al consumo de las fuentes de carbono de fácil asimilación y disposición dentro de la matriz vegetal, las cuales en su mayoría son azúcares como glucosa y fructosa (Favadi *et al.*, 2005).

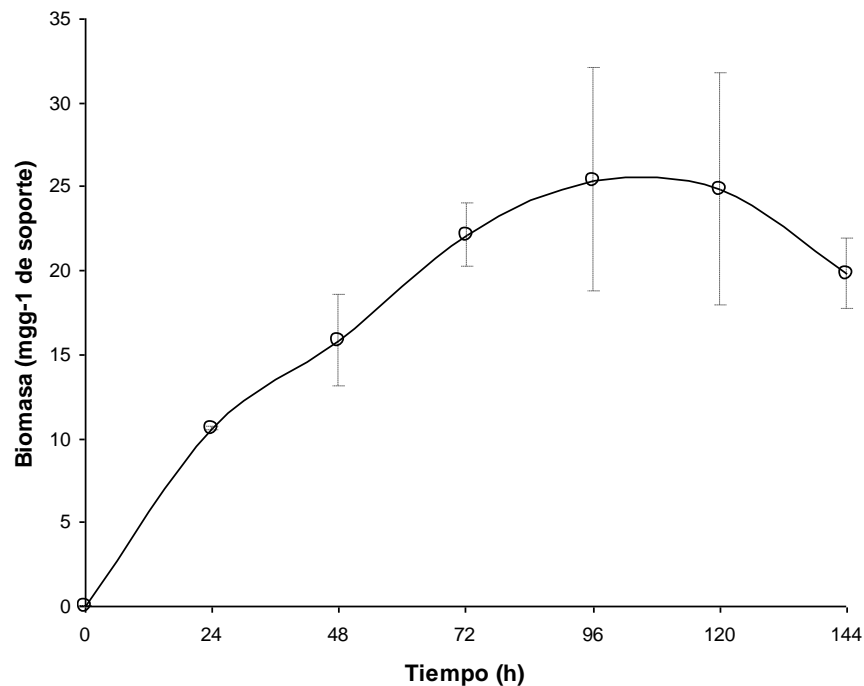


Figura 10. Curva de crecimiento de *Aspergillus niger* GH1 sobre cáscara de granada en polvo.

Dentro de las variables medidas durante el cultivo, se encuentran el pH y la actividad de agua (Figura 11). La modificación al valor de pH no presentó una

variación significativa dentro del tiempo de cultivo, manteniéndose entre 4 y 5 de pH. Para la producción de ácido elálgico a partir de roble reportan los mismos valores que los obtenidos (Huang *et al.*, 2005).

La actividad de agua presentó una disminución en función del tiempo, iniciando con un valor 0.98 el cual, disminuyó hasta un nivel de 0.95 a las 144 h de cultivo. Los valores se encuentran dentro del rango de a_w (0.95 a 0.99) adecuado para el crecimiento de *Aspergillus niger* (Parra *et al.*, 2004). La actividad de agua es un factor limitante para el crecimiento de *A. niger* en valores menores a 0.92 (Ni y Streett, 2005).

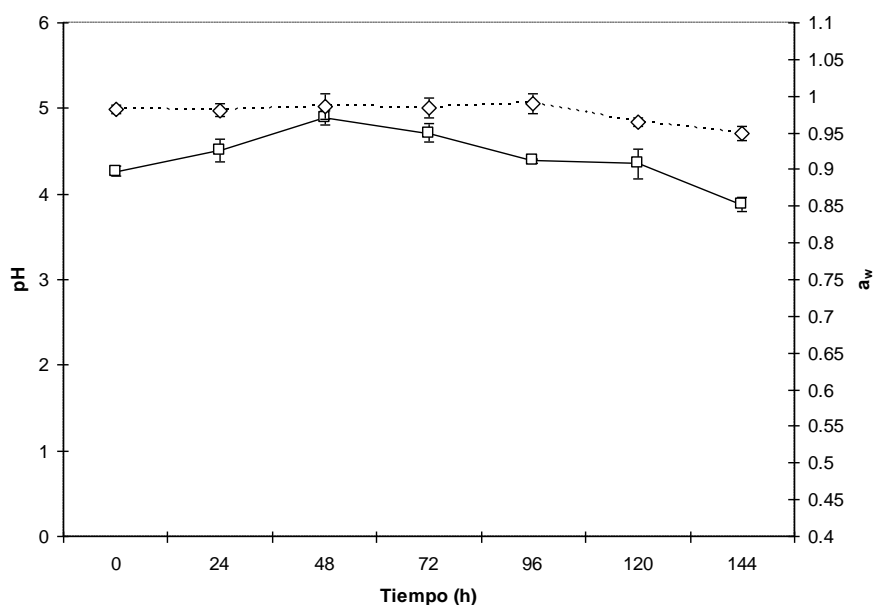


Figura 11. Curva cinética de pH (\square) y actividad de agua (\diamond) en CMS sobre cáscara de granada en polvo por *A. niger* GH1.

El hongo fue capaz de consumir los azúcares presentes en la matriz compleja de la cáscara de granada (Figura 12). El mayor consumo se observó a las 72 h del cultivo, a una velocidad de 46.86 mg de azúcares/g de soporte por día, lo que se ve reflejado en el crecimiento micelial (Figuras 9 y 10).

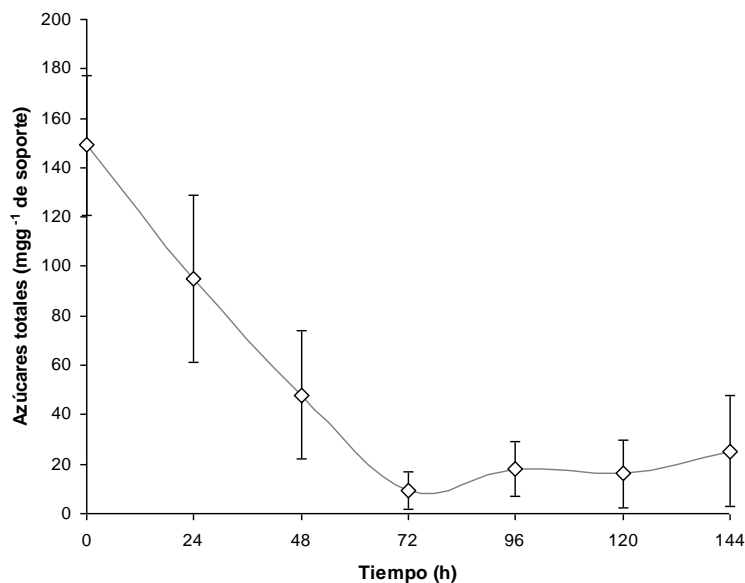


Figura 12. Cinética de consumo de azúcares totales en CMS por *Aspergillus niger* GH1 sobre cáscara de granada en polvo.

A las 72 h se consume cerca del 85 % del sustrato disponible y se mantiene sin cambios significativos hasta el final del CMS. Sin embargo, se observa un ligero incremento en la concentración del sustrato, después de las 120 h. Esto puede ser atribuido a la degradación de diferentes azúcares poliméricos presentes tales como, la pectina, lignina y los azúcares asociados a estos, (ramnosa, arabinosa, ácido galacturónico y otros), generando azúcares libres que posteriormente serán consumidos.

Además, la hidrólisis de los elagitaninos produce la liberación del azúcar de la molécula, en el caso de la cáscara de granada punicalagina, sus isómeros y derivados como la molécula de [2,3-hexahidroxidifenil-4,6-galagilglucosa], también, punicalina [4,6-galagilglucosa], ácido gálgico y glicósidos de ácido elálgico (hexosidos y pentosidos) (Seeram *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2003; Okuda *et al.*, 1995).

Los elagitaninos de la cáscara de granda en polvo, fueron el sustrato para la producción de ácido elálgico, el consumo de estos se muestra en la figura 13.

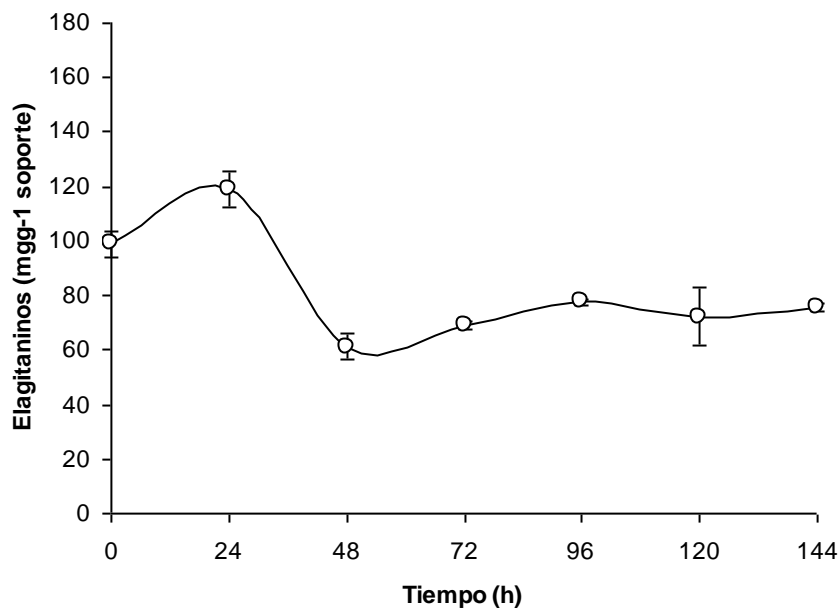


Figura 13. Cinética de consumo de elagitaninos en CMS por *Aspergillus niger* GH1 sobre cáscara de granada en polvo.

El contenido de elagitaninos presenta un incremento a las 24 h de cultivo del 20 %, y posteriormente decrece considerablemente, para mantenerse dentro de los 80 y 60 mgg^{-1} de soporte. Este comportamiento posiblemente se deba a la solubilización de los compuestos expuestos al medio líquido durante el periodo de incubación, lo que no ocurrió con el tiempo cero (control), el cual fue inmediatamente tratado al adicionar el medio y no permitió la solubilización adecuada de los elagitaninos. A las 48 h se consume el 40 % de los polifenoles totales y a las 72 h de cultivo se aprecia un ligero incremento manteniendo un comportamiento senoidal hasta las 144 h. Este comportamiento se puede deber a la degradación y consumo de polifenoles totales (Figura 13).

Durante el experimento se determinó la actividad enzimática tanasa por el método de Sharma *et al.* (2000). El valor máximo de la actividad tanasa fue de 550 U/L y se obtuvo a las 96 h del cultivo (Figura 14). Es muy importante mencionar que la producción de la enzima tanasa aun no está bien relacionada con la hidrólisis de elagitaninos.

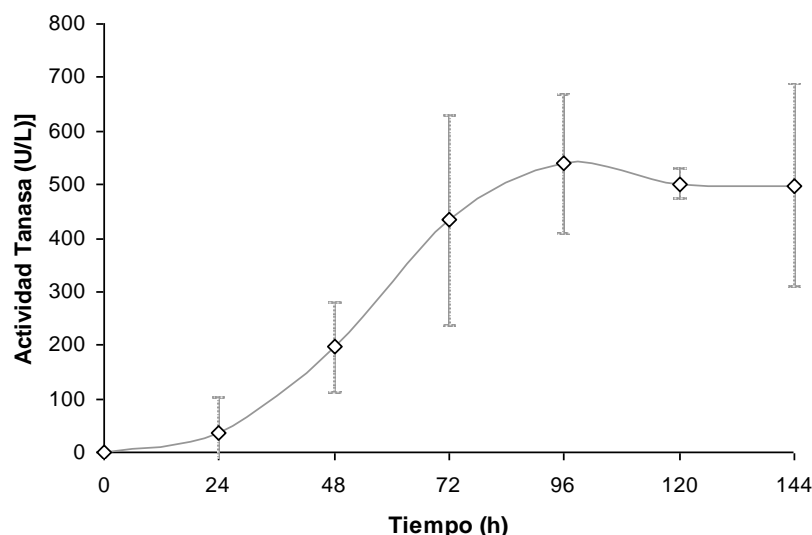


Figura 14. Curva cinética de producción de tanasa en CMS por *Aspergillus niger* GH1 sobre cáscara de granada en polvo.

El cultivo en medio sólido sobre cáscara de granada en polvo utilizando *Aspergillus niger* GH1, generó 10.83 mg de AE/g de soporte, partiendo de los 1.56 mg de AE libre/g de soporte, para acumular un total de 12.39 ± 4.0 mg de AE/g de soporte (Figura 15). En la figura 16 se presenta el cromatograma de la acumulación de ácido elágico durante la cinética en CMS.

La acumulación de ácido elágico supera notablemente los valores reportados en la literatura para pomaza de arándano, donde obtienen una acumulación de 0.116 mgg^{-1} en extractos acuosos adicionando 0.5 g de NH_4NO_3 y 0.350 mgg^{-1} en extractos etanólicos adicionando hidrolizado de proteína de pescado, ambos a los 5 d de fermentación con *Rhizopus oligosporum* (Vattem y Shetty, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos están por debajo de los reportados por Huang *et al.* (2006) usando *Aspergillus niger* SHL 6 y taninos de valonea en medio líquido (160.0 mgg^{-1}).

La disminución de la concentración del ácido elágico después de las 120 h de cultivo, posiblemente se deba a que el ácido elágico forme complejos con otros compuestos del soporte e inclusive con las enzimas presentes en el cultivo o bien la degradación del ácido elágico en ácido gálico vía enzimática, por las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa (Mingshu *et al.*, 2007; Aguilera-Carbo, *et al.*, 2008) (Apéndice A).

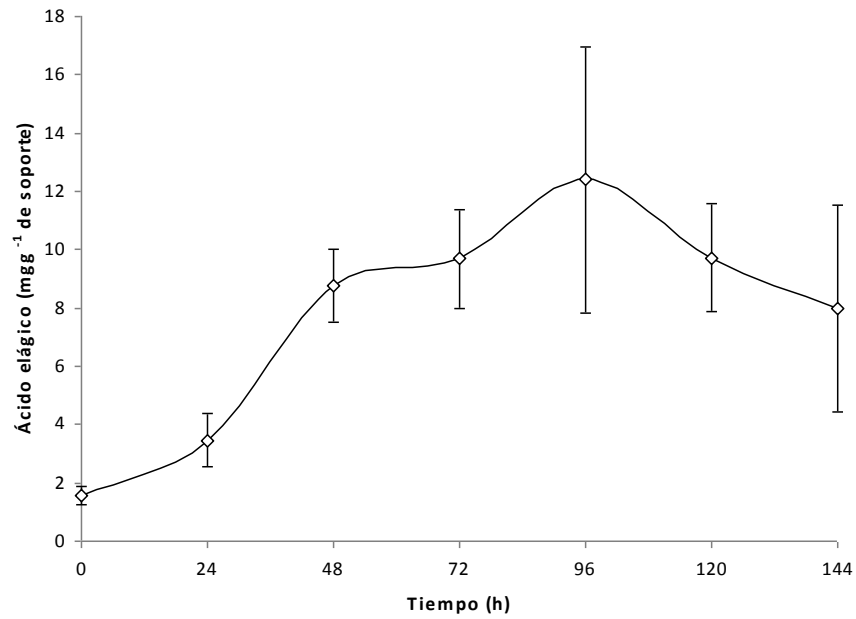


Figura 15. Cinética de acumulación de ácido elálgico en CMS por *Aspergillus niger* GH1 sobre cáscara de granada en polvo.

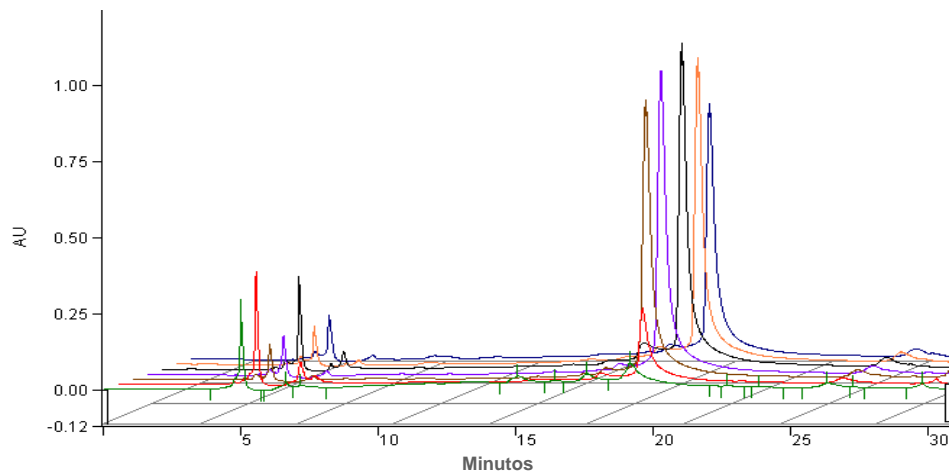


Figura 16. Cromatograma de la acumulación de ácido elálgico en CMS. Línea verde (tiempo 0), línea roja (24 h), línea café (48 h), línea violeta (72 h), línea negra (96 h), línea amarilla (120 h), línea azul (144 h).

Los parámetros cinéticos evaluados bajo las condiciones del ensayo, se muestran en la tabla 22. Es importante señalar que el rendimiento es de 0.0487 mgAE por gramo de biomasa. Sin embargo, este valor es bajo con respecto a los reportes de la producción AE con otras fuentes como el roble (Huang *et al.*, 2007 y 2008). Estos valores demuestran que es necesario optimizar el CMS para mejorar la producción de AE utilizando la cáscara de granada.

Tabla 22. Parámetros cinéticos máximos alcanzados en el CMS.

$Y_{X/S}$ (mgX/gS)	qS (mgX/gS.h)	qP (mgAE/gX.h)	P (mgAE/gS.día)	m (gS/gXh)
357.247	298.358	0.487	0.085	0.0341

6.3.2 Cinética de producción del extracto enzimático con actividad elagitanasa y de ácido elálgico por *Aspergillus niger* GH1 usando espuma de poliuretano como soporte inerte

A continuación se presentan los resultados de la cinética conducida para obtener el extracto enzimático con actividad elagitanasa.

Durante el cultivo se monitoreó el consumo de azúcares totales (Figura 17). El sustrato se redujo hasta en un 60 % durante las primeras 36 h y se mantuvo con un comportamiento similar al obtenido para la cinética con extracto de polvo de cáscara de granada como fuente de carbono. Esto se ve reflejado en la producción de biomasa en el cultivo (Figura 18).

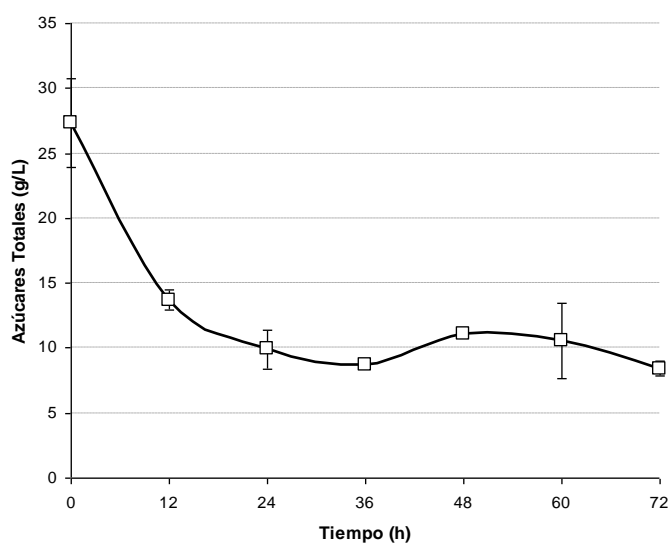


Figura 17. Consumo de azúcares del extracto de cáscara de granada en CMS.

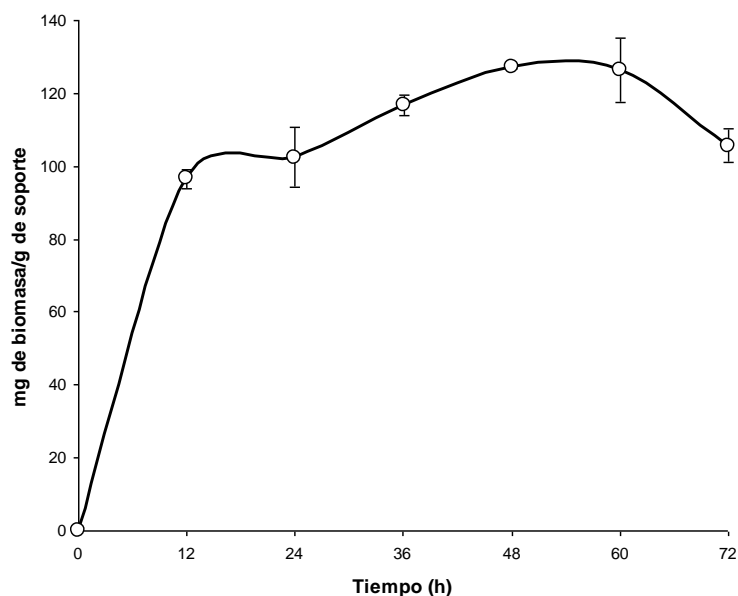


Figura 18. Cinética de producción de biomasa en CMS por *Aspergillus niger* GH1 empleando extracto de cáscara de granada en polvo.

Los resultados del consumo de polifenoles totales de cáscara de granada, muestran que éstos disminuyeron hasta un 80 % durante las primeras 24 h del cultivo. Sin embargo, es importante notar que el contenido se incrementa nuevamente como resultado de la degradación de los taninos presentes, alcanzado una acumulación del 50 % a las 36 h del cultivo y finalmente disminuye gradualmente hasta alcanzar un consumo de 75 % del contenido inicial a las 72 h de cultivo, es decir se consumen aproximadamente 14.25 gL^{-1} (Figura 19). El incremento de polifenoles totales se puede explicar por la liberación de monofenoles a partir de elagitaninos que “incrementan” la concentración reactiva en función de su liberación y acumulación en el medio de cultivo; en este tiempo la velocidad de hidrólisis de los polifenoles es mayor que la velocidad de consumo de los mismos por el microorganismo.

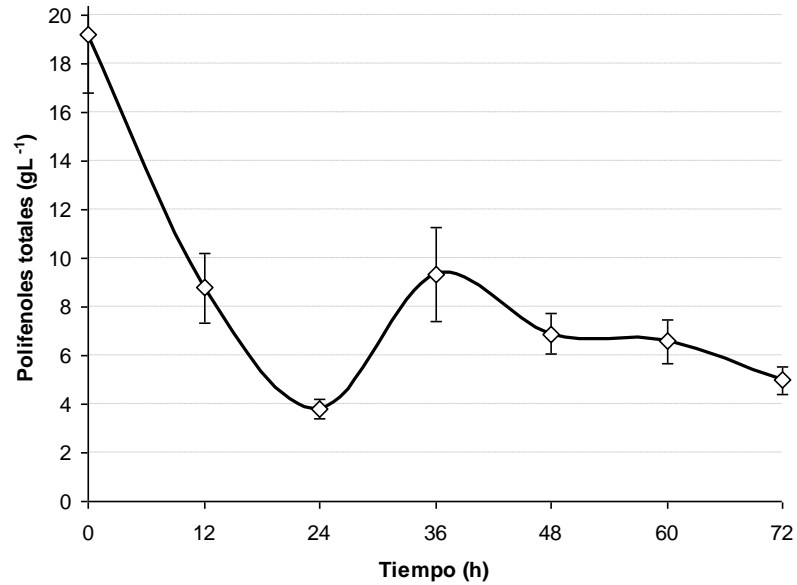


Figura 19. Consumo de polifenoles totales del extracto de cáscara de granada en CMS.

La producción máxima de ácido elálgico se obtuvo a las 48 h de cultivo con una concentración de $371.97 \pm 18.0 \text{ mgL}^{-1}$ (Figura 21) a partir del extracto de cáscara de granada (Figura 20).

La mayor concentración de actividad enzimática se obtuvo a las 48 h de cultivo con $44.5 \pm 1.5 \text{ U/L}$ de elagitanasa (Figura 21), el extracto enzimático obtenido a este tiempo se empleó para concentrar la proteína y determinar las mejores condiciones del ensayo enzimático para la actividad elagitanasa.

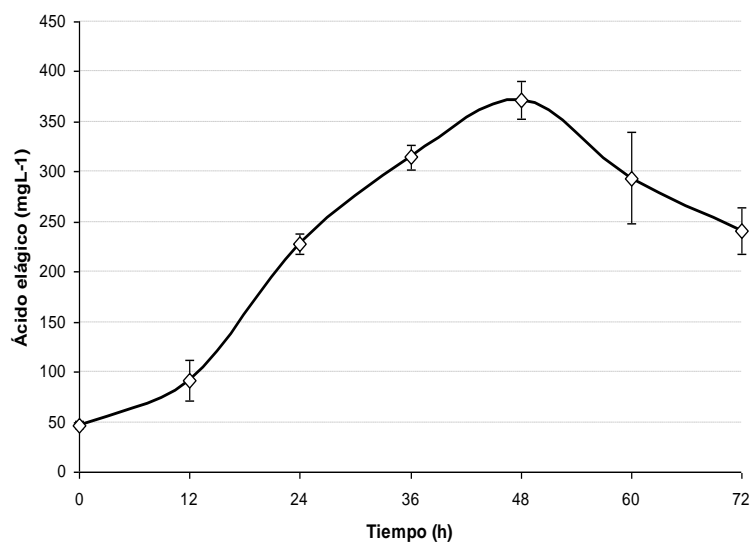


Figura 20. Producción de ácido elálgico por gramo de cáscara de granada.

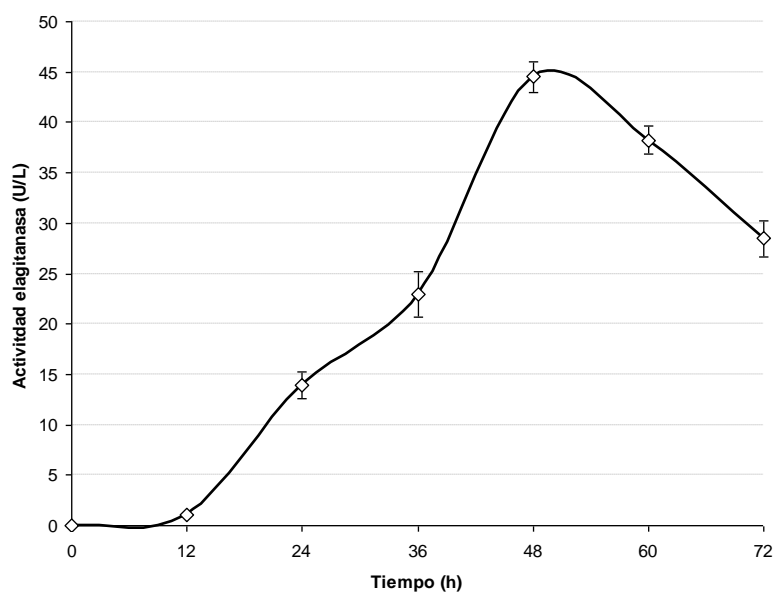


Figura 21. Actividad enzimática elagitanasa en CMS.

La acumulación de ácido elágico fue 50 % (5.4 mg/g de cáscara de granada en polvo) menor a la obtenida en cultivo en medio sólido empleando el polvo de cáscara de granada (*ver 6.3.1*). Es decir que el empleo del extracto de cáscara de granada como fuente de elagitaninos absorbidos en la matriz de poliuretano, no favorece la recuperación del ácido elágico, muy probablemente tiene que ver con la solubilidad de la molécula y no se descarta la posible formación de complejos entre las moléculas de ácido elágico y las moléculas del poliuretano. Asimismo, la acumulación de ácido elágico alcanzada en este estudio fue menor a la reportada por Huang *et al.* (2004) quienes emplearon taninos de valonea en un cultivo sumergido y quienes al momento son los que han reportado el mayor valor de acumulación del ácido por cultivos microbianos.

A pesar de lo anterior, el extracto obtenido es más fácil de manejar para llevar a cabo la purificación de la enzima elagitanasa; por lo que se usó este sistema de cultivo para los estudios de obtención de elagitanasa.

6.3.3 Obtención de la fracción con actividad enzimática elagitanasa

El extracto enzimático obtenido a las 48 h del cultivo en CMS, se sometió a diálisis por 48 h en solución amortiguadora de acetatos pH 5 [25 μ M] para eliminar moléculas de bajo peso molecular. Después del dializado, se tomaron alícuotas que se separaron en una columna G-25 de acuerdo al peso molecular, se obtuvieron 8

fracciones. La fracción 2 presentó la mayor actividad elagitanasa; en la figura 22 se observa en el eje de las abscisas (x) el número de fracciones obtenidas, en el eje de las ordenadas (y) representa el registro de los cambios en el detector a una longitud de onda de 280 nm representada en miliunidades de área (mAu) y en el eje primo de las ordenadas (y') representan la actividad enzimática elagitanasa. Si bien las unidades de actividad son bajas, se logró concentrar a las enzimas en un fracción de tal manera que se obtuvieron 8.0 mL de la fracción, para ser usados en el establecimiento de las condiciones de operación del ensayo de evaluación de la actividad elagitanasa.

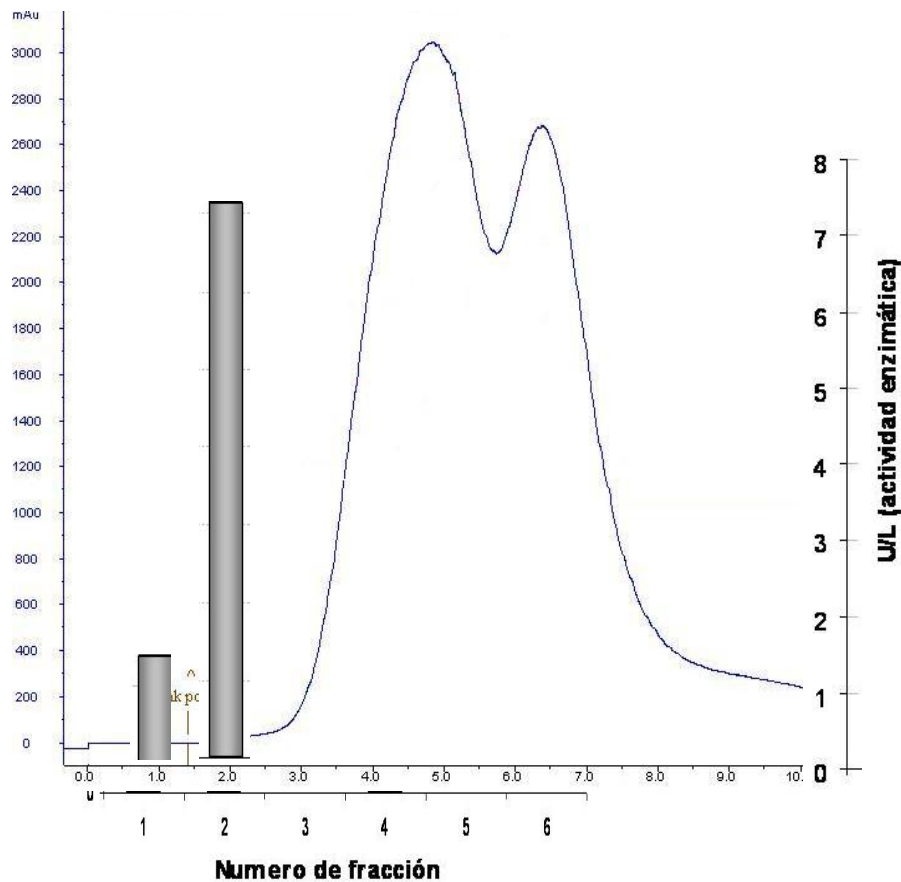


Figura 22. Actividad enzimática elagitanasa de las fracciones obtenidas en la columna G-25 de exclusión molecular.

La fracción 2 obtenida con la columna G-25 se sometió a fraccionamiento en una columna de intercambio aniónico QXL, en la que se obtuvieron 45 fracciones, los resultados obtenidos revelaron que las fracciones 34 y 39 tuvieron actividad elagitanasa (figura 23), si bien, los resultados aun son bajos, nos permitió la purificación de la enzima, lo cual se observa en la figura 24 A y B, donde en el carril

F-34 QXL solo se obtuvo una banda de un peso molecular aproximado de 200 kDa, también se aprecia en el carril F-2 G-25, 3 tres bandas, una de 200 kDa que coincide con la de la fracción 34 de QXL, otra de 80 kDa, que de acuerdo a la literatura coincide con una subunidad de la enzima tanasa (Bhardwaj *et al.*, 2003), la cual no se aprecia en el carril de la fracción 34 de QXL y una más de 30 kDa, de la cual, no se tiene referencia sobre enzimas de bajo peso molecular con actividad degradadora de taninos, o bien puede ser un fragmento de las antes mencionadas.

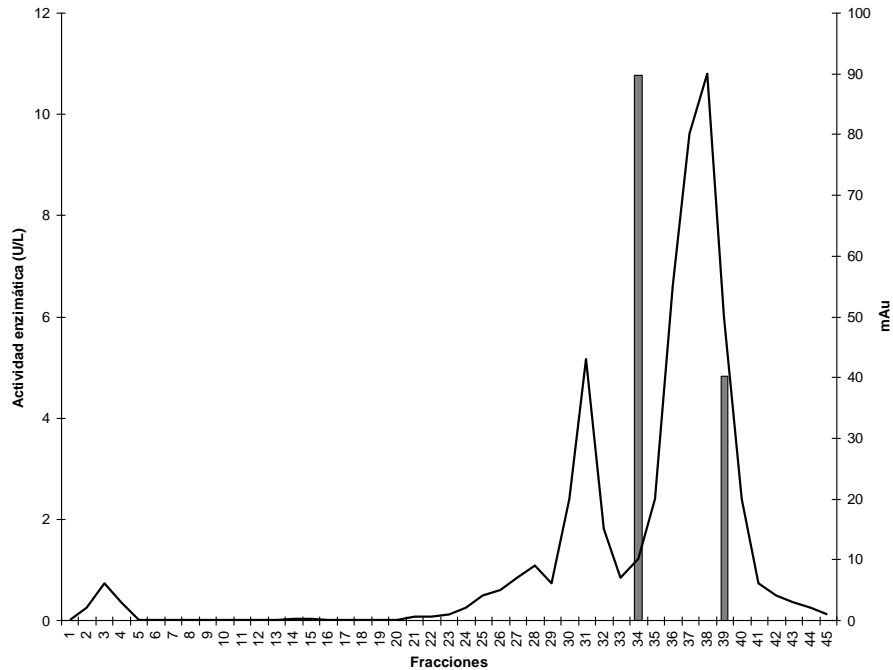


Figura 23. Actividad enzimática de las fracciones obtenidas en la columna QXL. (---); (barras en gris) la actividad enzimática de las fracciones.

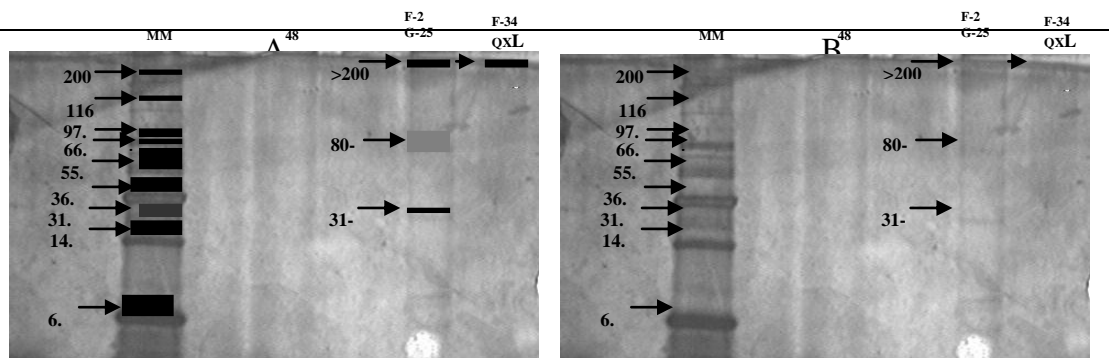


Figura 24. Geles de poliacrilamida SDS de las fracciones de obtenidas en FPLC. A) Representación de las bandas obtenidas, B) Fotografía del gel.

MM. Marcador molecular

F-2 G25. Fracción No. 2, obtenida con una columna de exclusión molecular.

F-34 QXL. Fracción No. 34, obtenida con una columna de intercambio aniónico.

6.4 Desarrollo de la metodología para la evaluación de la actividad elagitanasa

Inicialmente se modificó el método para determinación de la actividad tanasa propuesto por Beverini y Metche en 1990 y reportado por Aguilar y colaboradores (2001a). Para evaluar la actividad enzimática elagitanasa se cambió el sustrato y el tiempo de reacción. En la primera modificación del método se emplearon las siguientes condiciones: temperatura 30°C, pH 5.0 y tiempo de reacción de 120 min, bajo estas condiciones y usando el equipo de HPLC para monitorear el producto de la reacción, de esta manera se evaluó la actividad enzimática en las figuras, 21, 22 y 23.

Sin embargo, fue necesario establecer las mejores condiciones para la evaluación de la actividad enzimática elagitanasa, en primer término se evaluó el efecto de la concentración molar de ácido clorhídrico para detener la reacción y aun más importante, que la solución empleada no degrade al sustrato. Los resultados se observan en la figura 25, se aprecia que no existe diferencia significativa entre el control y las concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5 M, sin embargo, la concentración 2.0 M exhibe un ligero incremento no es significativo comparado con el control. Debido a los resultados obtenidos se decidió emplear la concentración de 1.5 M, ya que no muestra un efecto hidrolítico sobre el sustrato.

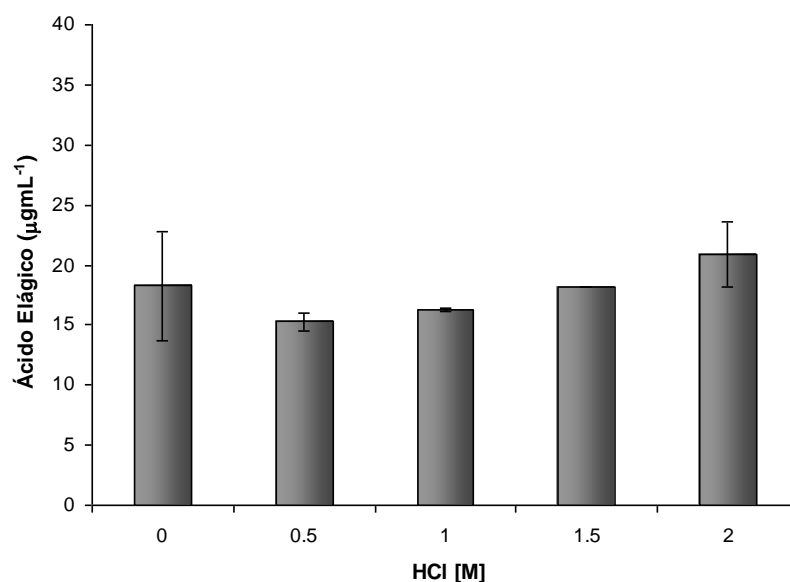


Figura 25. Efecto de la concentración de ácido clorhídrico sobre el sustrato empleado para determinar la actividad elagitanasa.

En cuanto al efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática (Figura 26), se aprecia que utilizando una concentración de 1 mgmL^{-1} se obtiene una actividad mayor que con las demás concentraciones evaluadas, esto puede deberse a una inhibición por sustrato o por producto. Otro aspecto importante es la capacidad de acomplejamiento del producto con las proteínas en sitios diferentes al catalítico modificando la conformación de la misma, el ácido elálgico se caracteriza por reaccionar con los grupos prolina de las proteínas (Edelmann, *et al.*, 2002).

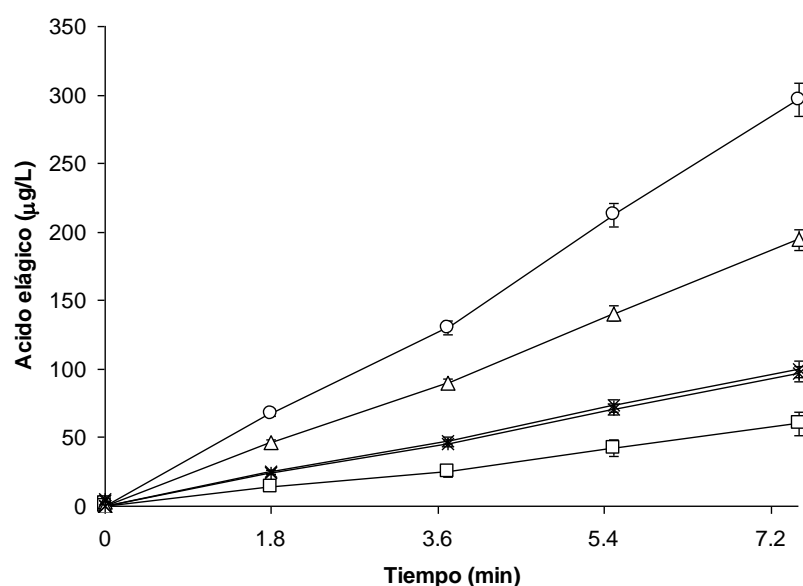


Figura 26. Efecto de la concentración inicial de elagitanos sobre la actividad elagitanasa. 1 (o), 2 (◊), 3 (Δ), 4 (x) y 5 (*) mgmL^{-1} .

La máxima actividad enzimática con respecto a la concentración de sustrato se muestra en la figura 27, al igual que en la figura 26, se observa que la concentración de 2.0 mgmL^{-1} , no sigue un patrón similar a los sustratos de mayor concentración, sin embargo, la tendencia es a la disminución de la actividad enzimática.

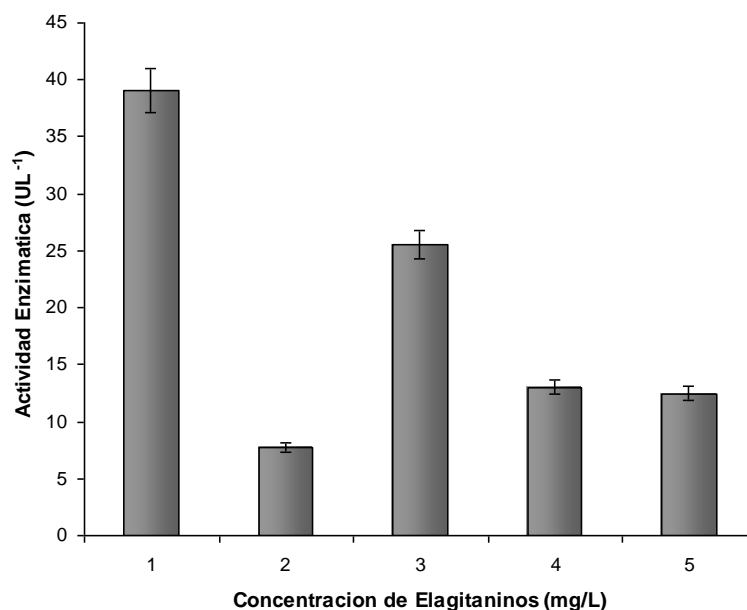


Figura 27. Actividad enzimática de punto máximo evaluado a diferentes concentraciones de sustrato.

El comportamiento observado en el estudio cinético reveló que la concentración de 1.0 mgmL^{-1} de sustrato a un tiempo de 7 min, se obtuvo la mayor expresión de la enzima, el patrón de incremento de la actividad en función del tiempo, permitieron realizar un ensayo singular para evidenciar la tendencia de actividad a mayor tiempo de reacción y obtener el mejor tiempo para evaluar la actividad elagitanasa, estos resultados se muestran en la figura 28, se observa un incremento gradual en función del tiempo durante los primeros minutos, obteniéndose la máxima actividad a los 7.5 minutos de reacción y disminuyendo al 50 % en el siguiente tiempo evaluado. La figura 28 concuerda con los valores bajos obtenidos en la primera modificación para el tiempo de 120 min.

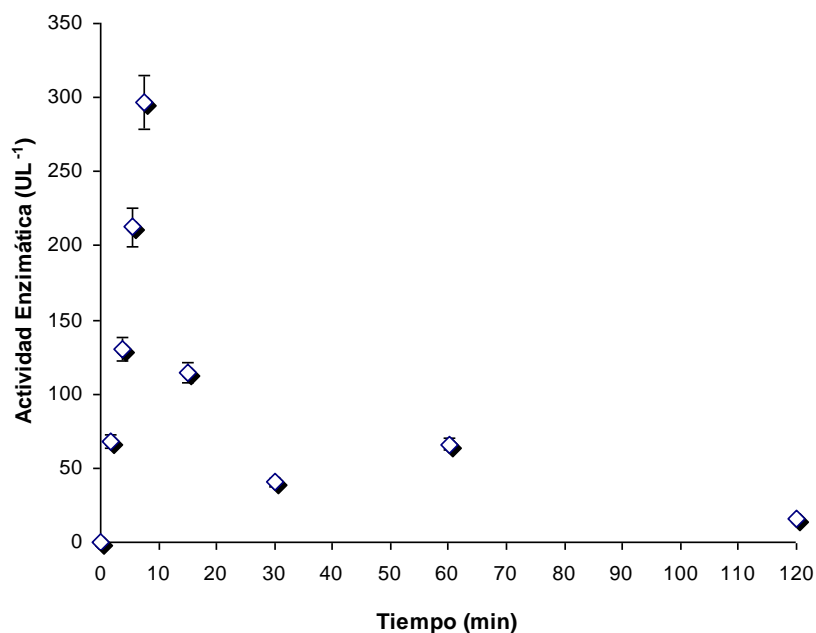


Figura 28. Evaluación de la actividad elagitanasa en función del tiempo.

En la tabla 24 se muestran las modificaciones de la metodología de Beverini y Metche (1990), la primera modificación y las mejores condiciones obtenidas en este ensayo.

6.5 Caracterización físico-química de la enzima elagitanasa

En la figura 29 se presenta la gráfica correspondiente a la actividad enzimática determinada a diferentes valores de pH, como se puede apreciar, a medida que se incrementa el pH de la solución de reacción, se experimenta un incremento en la actividad elagitanasa, con un máximo a pH de 5.0, a pH's mayores la actividad disminuye. Existen reportes donde se hace referencia a algunas enzimas producidas por este microorganismo como la tanasa, donde los valores de pH donde se presenta la máxima actividad son en un rango de 5.0 a 6.0 (Albertse, 2002). Huang *et al.* (2005) reporta que la máxima producción de ácido elágico empleando *Aspergillus niger* se obtiene a pH entre 4 y 5.

La disminución en la actividad a medida que se incrementa el pH está relacionada con la conformación de la enzima y la modificación de enlaces, y por ende de los sitios catalíticos. Además debido a la naturaleza protéica, el pH de la

solución tiene efecto sobre la solubilidad de la enzima, sin embargo, cuando se llega a su punto isoeléctrico provoca la precipitación de la misma.

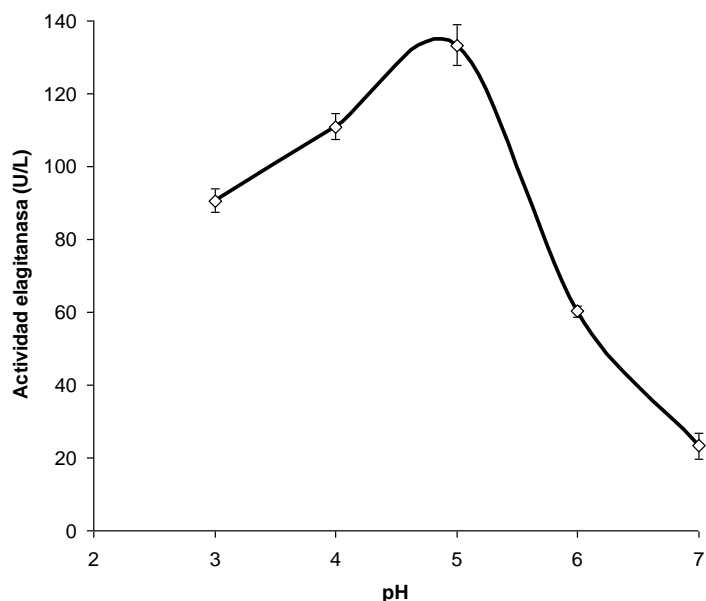


Figura 29. Actividad enzimática bajo diferentes valores de pH

En cuanto al efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática elagitanasa, mostró tener un efecto significativo, los resultados revelan que a mayor temperatura se incrementa la actividad enzimática. A de 60 °C se observó la máxima actividad, obteniéndose hasta casi 10 veces más actividad elagitanasa con respecto a la temperatura de 20 °C.

La forma en que la temperatura influye sobre la actividad enzimática es promoviendo una mayor número de colisiones entre la enzima y el sustrato, al igual que el pH, cuando se llega a cierta temperatura se presenta la inhibición de la enzima.

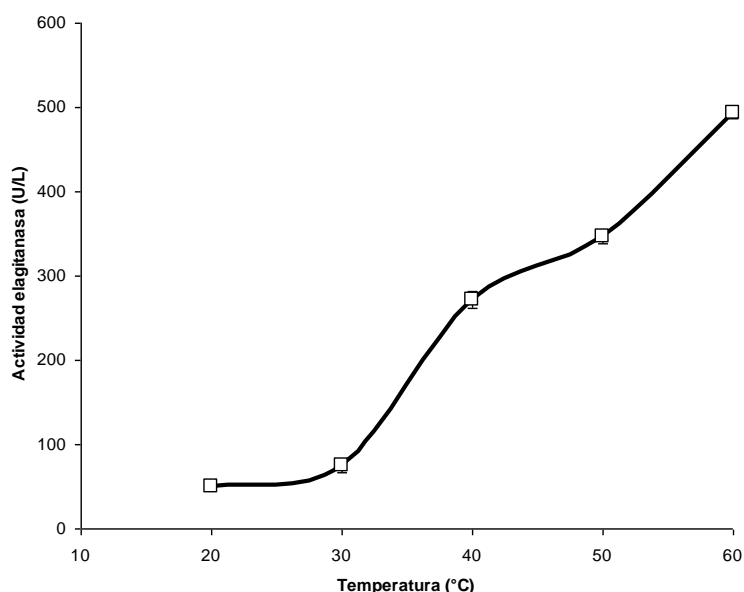


Figura 30. Actividad enzimática evaluada a diferentes temperaturas

Tabla 23. Comparativo de las condiciones del ensayo enzimático original, las modificaciones realizadas y las mejores condiciones encontradas.

Condiciones	Aguilar, C., (2001a)	Modificación 1	Mejores condiciones
pH	5.5	5.0	5.0
Temperatura (°C)	30	30	60
Sustrato	Ácido tánico	Elagitaninos	Elagitaninos
Tiempo de reacción (minutos)	30	120	10
Solución para detener la reacción	HCl 2 M	HCl 2M	HCl 1.5 M
Solución amortiguadora	Acetatos (50 mM)	Citratos (50 mM)	Citratos (50 mM)

Una vez que se obtuvo el extracto enzimático por prensado del material fermentado y como solución extractora amortiguadora de citratos 50mM pH 5.0, se recolectaron 1950 mL de extracto enzimático crudo, después de ser sometido a diálisis en membrana de celulosa, se tomó una fracción de 1000 mL y se concentró por UF, a partir de este paso se obtuvieron 43.5 mL de extracto. Posteriormente se realizó una cromatografía de filtración en gel colectándose 8 ml y finalmente una cromatografía de intercambio iónico usando una columna QXL con un intercambiador cargado positivamente y se obtuvieron 6.0 mL por fracción colectada.

En cuanto a los parámetros de purificación se observó una actividad específica elagitanasa del extracto enzimático crudo de 65.03 U/mg, con el paso de concentración por ultrafiltración se incrementó la actividad hasta 104.62 U/mg, en ciertas ocasiones la etapa de ultrafiltración además de servir como paso de concentración de la proteína de interés, sirve como paso de purificación, debido a la remoción de compuestos contaminantes. En este caso el factor de purificación se incrementó a 1.60, esto debido a que la membrana que se utilizó en el aparato de UF fue de 30 kDa favoreciendo con ello la eliminación de proteínas de bajos pesos moleculares y péptidos.

En la siguiente etapa utilizando la columna de filtración en gel G 25, la actividad específica y el factor de purificación disminuyen teniendo valores de 4.77U/mg y 0.0734 respectivamente.

Esta disminución está relacionada con la concentración de proteína que debe de contener el extracto para hacerlo pasar a través de esta columna, ya que se recomienda que el extracto tenga una concentración máxima de 70 mgmL⁻¹, para evitar los problemas relacionados con la viscosidad de la solución y con ello tener una separación eficiente.

Finalmente con la columna de intercambio iónico QXL se logró tener una actividad específica de 457.56 U/mg y un factor de purificación de 7.03, desafortunadamente no existen reportes de literatura con los cuales hacer una comparación con los resultados obtenidos en el presente trabajo, lo cual es por principio interesante como aportación al conocimiento científico. El resto de los parámetros de purificación se presentan en la tabla 24.

Tabla 24. Purificación de la elagitanasa

Fracción	Volumen (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad (U/mL)	Recuperación (%)	Actividad específica (U/mg)	Factor de purificación	Actividad total (U)
EE	1000	0.26	260	16.91	100	65.03	1	16910
Crudo								
UF	43.5	1.00	43.67	105.04	27.020	104.629	1.608	4569.248
G 25	8	0.190	1.523	0.91	0.143	4.779	0.073	7.28
QXL	6	0.0133	0.080	6.117	0.217	457.566	7.035	36.702

Finalmente, se muestra el gel de poliacrilamida con las bandas de la fracción 2 de la columna G25 y la banda de la fracción 39 de la columna QXL, (Figura 31), en donde se evidencia la purificación de la enzima, en la fracción 2 de G-25 se aprecian 2 bandas una de 120 kDa y otra de 200 kDa y finalmente en la fracción 39 de QXL con una sola banda correspondiente a la enzima elagitanasa.

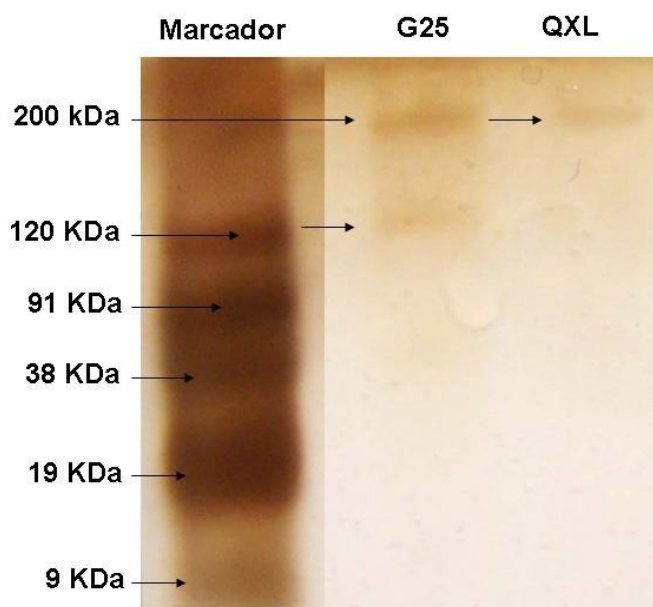


Figura 31. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fracciones obtenidas en las etapas de purificación.



7. Conclusiones

7.1 Conclusión general

Se caracterizó la enzima elagitanasa, la cual, tiene un peso molecular de 200 kDa, mayor actividad a pH 5.0 y 60°C, empleando una concentración de sustrato de 1.0 mgmL⁻¹. La enzima se produjo por *Aspergillus niger* GH1 en cultivo en medio sólido empleando como sustrato extracto de cáscara de granada y espuma de poliuretano como soporte sólido.

7.2 Conclusiones particulares

- La cáscara de granada fue el material vegetal con mayor concentración de elagitaninos (5.3 %) de un total de cinco especies evaluadas.
- Se evidenció que especies vegetales del Desierto Chihuahuense contienen elagitaninos y son fuentes potenciales de estos fitoquímicos.
- Las cepas de *Aspergillus niger* GH1 y PSH crecieron en un medio rico en elagitaninos.
- Se determinó la actividad elagitanasa modificando el método reportado por Beverini y Metche (1990), empleando cromatografía líquida.
- Se produjo y caracterizó parcialmente la enzima elagitanasa.
- Se desarrolló un protocolo de purificación de la enzima elagitanasa logrando obtener un factor de purificación de 7.0.



8. Contribuciones científicas

8.1 Participación en congresos nacionales e internacionales

“XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería” y “VII Congreso Latinoamericano de Biotecnología y Bioingeniería”. **Capacidad de crecimiento de *Aspergillus niger* GH1 y PSH en diferentes sustratos ricos en elagitaninos y ácido eláxico.** Mérida, Yucatán, México. 18-23 de septiembre del 2005.

“5th International Congress on Food Technology”. **Ellagic acid production by solid state culture using a *Punica granatum* husk aqueous extract as culture broth.**
Aguilera-Carbo AF, Hernández-Rivera JS, Prado-Barragán LA, Augur C, Favela-Torres E and Aguilar CN. March 9-11, Thessaloniki, Greece, 2007.

“5th International Congress on Food Technology”. **Method for ellagic acid quantification in novel sources of this natural antioxidant.**
Aguilera-Carbo AF, Robledo-Olivo A, Augur C, Prado-Barragán LA, Favela-Torres E and Aguilar CN. March 9-11, Thessaloniki, Greece, 2007.

“Power of Microbes in Industry and Environment”. **Ellagic acid Production by *Aspergillus niger* GH1 in solid state culture.**
Aguilera-Carbó A., Hernández-Rivera J.S., Augur C.,Prado-Barragán A., Aguilar C.N., and Favela-Torres E. September 19-22, Zadar, Croatia, 2007.

8.2 Artículos en revistas internacionales

Aguilera-Carbo AF, Augur C, Prado-Barragan LA, Favela-Torres E and Aguilar CN (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78(2): 189-199. DOI: 10.1007/s00253-007-1276-2.

Antonio F. Aguilera-Carbo, Christopher Augur, Lilia A. Prado-Barragan, Cristóbal N. Aguilar, Ernesto Favela-Torres. (2008). Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. *Chemical papers*. 62(4) 440-444.

Antonio Aguilera-Carbo, Juan S. Hernández, Christopher Augur, Lilia A. Prado-Barragan, Ernesto Favela-Torres, Cristóbal N. Aguilar (2008). Ellagic Acid Production from Biodegradation of Creosote Bush Ellagitannins by *Aspergillus niger* in Solid State Culture. *Food Bioprocess Technol*. DOI 10.1007/s11947-008-0063-0.



9. Perspectivas

La presente investigación establece un precedente en el área de investigación de elagitaninos, esto nos permite revelar una serie de perspectivas en el tema, las cuales se enumeran a continuación:

1. Caracterización completa de la enzima elagitanasa, que incluya, especificidad por diferentes sustratos, efecto de cofactores, ausencia de oxígeno y otros.
2. Caracterización aminoacídica de la enzima elagitanasa, conocer su conformación y evidenciar los sitios catalíticos.
3. Determinar las mejores condiciones de producción de la enzima elagitanasa empleando el sistema de cultivo en medio sólido.
4. En cuanto al ácido elágico se pueden dirigir diferentes líneas de investigación: a) Escalar la producción de ácido elágico, b) Hacer más eficiente la recuperación del ácido elágico, c) diversificar y evidenciar las aplicaciones del ácido elágico, al área farmacéutica, cosmética, alimentos y agronómica.
5. Promover la investigación en el área agrícola para mejorar e incrementar la producción de granada en México.
6. Desarrollar tecnología para el cultivo de plantas del semidesierto para obtener compuestos bioactivos, recordemos que se debe hacer el empleo racional y sustentable de los recursos naturales, esta premisa debe estar en primer plano para aprovechar de manera integral dichas especies.



10. Referencias Bibliográficas

- Abe I.**, Kashiwagi Y., Noguchi H., Tanaka T., Ikeshiro Y., Kashiwada Y. (2001). Ellagitannins and hexahydroxydiphenols esters as inhibitors of vertebrate squalene epoxidase. *J. Nat. Prod.* **64**:1010-1014.
- Aguilar C.N.**, Augur C., Favela-Torres E., Vieniagra-González G. (2001a). Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry.* **36**(6): 571-578.
- Aguilar C.N.**, Augur C., Favela-Torres E., Vieniagra-González, G. (2001b). Production of tannase by *Aspergillus niger* As-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. *J Ind Microbial Biotechnol.* **26**(5):296-302.
- Aguilar C.N.**, Aguilera-Carbo A., Robledo A., Ventura J., Belmares R., Martínez D., Rodríguez-Herrera R., Contreras J. (2008). Production of antioxidant nutraceuticals by Solid-State cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Leaves. *Food Technol. Biotechnol.* **46**(2):218-222.
- Aguilera-Carbo A.**, Augur C., Prado-Barragan L.A., Favela-Torres E., Aguilar, C.N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **78**(2):189-199.
- Ahn D.**, Putt D., Kresty L.D., Storer G., Fromm D.F., Hollenberg P. (1996). *Carcinogenesis.* **17**(4):821-828.
- Akiyama H.**, Fujii K., Yamasaki O., Oono T., Iwatsuki K. (2001). Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* **48**: 487-491.
- Amakura Y.**, Miyake M., Ito H., Murakaru S., Araki S., Itho Y., Lu C-H., Yang L-L., Yen K-Y., Okuda T., Yoshida T. (1999). Acalyphidins M₁, M₂ and D₁, ellagitannins from *Acalypha hispida*. *Phytochemistry.* **50**:667-675.
- Amakura Y.**, Umino Y., Tsuji S., Tonogai Y. (2000). Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. *J. Agric. Food Chem.* **48**:6292-6297.
- Anderson K.J.**, Teuber S.S., Gobeille A., Cremin P., Whaterhouse A.L., Steinberg, F.M. (2001). Walnut Polyphenols inhibit In Vitro Human Plasma and LDL Oxidation. *Journal of Nutrition.* **131**: 2837-2842.
- Andrade P.**, Ferreres, F., Gil M.I., Tomás-Barberán F.A. (1997). Determination of Phenolic Compounds in Honeys with Different Floral Origin by Capillary Zone Electrophoresis. *Food Chemistry.* **60**: 79-84.
- Arredondo V.D.G.** (1981). *Tesis licenciatura*. Componentes de la vegetación del rancho demostrativo “Los Ángeles” UAAAN. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Buenavista, Coahuila, México. 284p.
- Ascacio-Valdes J.A.** *Tesis Licenciatura* (2007). Obtención de ácido elálgico de fuentes no convencionales. Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad

de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., Volkova N., Kaplan M., Coleman R., Hayek T., Presser D., Fuhrman B. (2000). Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: Studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice^{1,2}. *Am J Clin Nutr.* 71:1062-1076.

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

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

Belmares-Cerda R.E. (2004). Composición y biodegradación fúngica de algunos compuestos polifenólicos presentes en plantas del semidesierto mexicano. *Tesis de Maestría* Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila México.

Benson L. and R.A. Darrow. (1981). Trees and Shurbs of the Southwestern deserts. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. United States of America. 416 p.

Betnoit R.E., Starkey R.L., Basaraba J. (1968). Effect of purified plant tannin on decomposition of some organic compounds and plant materials. *Soil Society.* 105:153-158.

Bhardwaj R., Shing B., Bhat T.J. (2003). Purification and Characterization of tannin acyl hydrolase from *Aspergillus niger* MTCC 2425. *J. Basic Microbiol.* 43(6):449-461.

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

Botkin C.W. and P.C. Duisberg. (1949). The Nordihidroguajaretic acid content of the Creostebush. Bull, 349, New Mexico State College. 15p.

Bradford M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dande binding. *Analytical Biochemical.* 72:28-254.

Buffington L.C. and C.H. Herbel. (1965). Vegetation Changes on a Semidesert Grass Land Range from 1858 to 1963. *Ecol. Monography*, 35:139-164.

Cerdá B., Espin J.C., Parra S., Martínez P., Tomás-Barberán F.A. (2004). The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolized into bioavailable but poor antioxidant hydroxyl-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *Eur J Nutr.* 43:205-220.

Chen L-G., Yen K-Y., Yang L-L., Hatano T., Okuda T., Yoshida T. (1999). Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphiins D₁ and D₂, and accompanying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Phytochemistry.* 50: 307-312.

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

Constantin R. (1997). Boosting ellagic acid in Strawberries. *Agricultural Research.* August: 16-18.

Correll D.S. and M.C. Johnston. (1970). Manual of the Vascular Plants of Texas. Texas Research Foundation, Ranner, Texas 1881 p.

Cruz-Hernández, M. (2002). Aislamiento y caracterización de cepas fúngicas degradadoras de taninos. Tesis de licenciatura. Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

- Cruz-Hernández M.**, Contreras-Esquivel J.C., Lara F., Rodríguez R., Aguilar C.N. (2005). Isolation and evaluation of tannin-degrading fungal strains from the Mexican desert. *Z. Naturforsch.* **60**:844-848.
- Da Porto C.**, Calligaris S., Celotti E., Nicoli M.C. (2000). Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH* Test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **48**: 4241-4245.
- Damodaran M.** and K.R. Nair. (1936). A tannin from the Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica*) with a protective action on ascorbic acid. *Biochem. J.* **30**:1014-1020.
- De Ancos B.**, González, E.M., Cano P. (2000). Ellagic acid, vitamin C and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **48**: 4565-4570.
- De las Fuentes V.** (1970). Utilización de la gobernadora (*Larrea tridentata*) como forraje en comparación con alfalfa (*Medicago sativa L.*). Monterrey, I.T.E.S.M. tesis.
- Deschamps A.**, Otuk G., Lebeault, J. (1983). Production of tannase and degradation chestnut tannin by bacteria. *Journal of Fermentation Technology* **61**: 55-59.
- Doussot F.**, Pardon P., Dedier J., De Jeso B. (2000). Individual, species and geographic origin influence on cooperage oak extractable content (*Quercus robur L.* and *Quercus petraea Liebl.*). *Analysis* **28**. 960-965.
- Dubois M.**, Guiles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.* **28**:145-149.
- Edelmann A.** and B. Lendl. (2002). Toward the Optical Tongue: Flow-Through Sensing of Tannin-Protein Interactions Based on FTIR Spectroscopy. *Journal of American Chemistry Society.* **124** (49): 14741-14747.
- El-Toumy.**, Sayed A.A., Marzouk M.K., Rauwald H.W. (2001). Ellagi- and gallotannins from *Punica granatum* heartwood. *Pharmazie* **56**: 823-824.
- El-Toumy.**, Sayed A.A., Rauwald H.W. (2002). Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Pharmazie* **61**: 971-974.
- Favadi A.**, Berzegar M., Azizi M.H., Bayat M. (2005). Note. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum L.*) grown in Iran. *Food Science and Technology International.* **11**(2):113-119.
- Feldman K.S.**, Saharabudhe K., Smith R.S., Scheuchzuber W.J. (1999). Immunostimulation by Plant polyphenols: Relationship between tumor necrosis factor- α production and tannin structure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **9**:985-990.
- Ferreres F.**, Blazquea M.A., Gil M.I. Tomas-Barberan F.A. (1994). Separation of Honey Flavonoids by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *Journal of Chromatography American.* **669**:268-274.
- Field J.A.** and G. Lettinga. (1992a). Toxicity of tannic compounds to microorganisms In: Hemingway RW & Lanks E (Eds) Plant Polyphenols: Synthesis, properties, Significance (pp. 673-692). Plenum Press, New York.
- Field, J.A.** and G. Lettinga. (1992b). Biodegradation of tannins. In: Sigel H. (Ed) Metal Ions in Biological systems Volume **28**. Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes (pp. 61-67). Marcel Dekker Inc. New York.
- Fukuda T.**, Ito H., Yoshida T. (2003). Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia L.*) *Phytochemistry.* **63**:795-801.

- Gatto M.**, Muratori S., Rinaldi S. (1998). A functional interpretation of the logistic equation, *Ecol. Modell.* **42**(2):155–159.
- Garro G.J.M.**, Riedl B. Conner A.H. (1997). Analytical Studies on Tara Tannins. *Holzforchung* **51**. 235-243.
- Gay C.W.**, Dwyer D.D., Steger R.E. (1970). New Mexico range plants. Circ. No. 374. New Mexico, State Univ. Unites of America. 85p.
- George E.** and S. Sen. (1960). *Bulletin of central Leathers Research Institute* **6**: 421-428.
- Gibbs H.D.** (1926). Phenols Test. II. Nitrous acid test. The million and similar test. Spectrophotometric investigations. *Journal of Biological and Chemistry.* 445-459.
- Gil M.I.**, Tomás-Barberán F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **48**: 4581-4589.
- Goldstein J.L.** and T. Swain. (1965). The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* **4**:185-192.
- González E.M.** (1975). *Tesis Licenciatura*. Distribución Especial de la vegetación y su interpretación sucesional en el norte del Estado de Zacatecas. Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México. p263.
- Goodwin T.** and E. Mercer. (1983). In: Introduction to plant Biochemistry 1: 528-566. Pergammon, N.Y.
- Gross G.G.** (1992). Enzymatic Synthesis of gallotannins and related compound. In *Phenolic Metabolism in Plants*; Sattford, H.A., Ibrahim, R.K. eds., Plenum Press, New York. 297-324.
- Häkkinen S.H.**, Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. (1998). HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *Journal of Society Food Agricultural.* **77**:543-551.
- Häkkinen S.H.**, Kärenlampi S.O., Mykkänen H.M., Törrönen A.R. (2000). Ellagic acid content in berries: Influence of domestic processing and storage. *European Food Research Technology.* **212**: 75-80.
- Hartzfel W.P.**, Forkner R., Hunter D.M. Hagerman E.A. (2002). Determination of Hydrolysable Tannis (Gallotannins and Ellagitannins) after Reaction with Potassium Iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50**: 1785-1790
- Haslam E.** (1989). Plant polyphenols– vegetable tannins revised. Cambridge University Press, Cambridge.
- Haslam E.** and Y. Cai. (1994). Plants Polyphenols (Vegetable tannins): Gallic acid metabolism. *Natural. Products Reports.* **11**:41-66.
- Haslam E.** and J.E. Strangoom. (1966). The esterase and Depsidase Activities of Tannase. *Biochemistry Journal.* **99**: 28-31.
- Hayashi T.**, Maruyana H., Kasai R., Hattori K., Takasuga S., Hazeki O., Yamasaky K., Tanaka T. (2002). Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as Activators of glucose transport in Fat Cells. *Letters Plant Med.* **68**:173-175.
- Huang W.**, Ni J., Borthwick A.G.L. (2005). Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of volonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus niger* SHL 6 *Process Biochemistry.* **40**(3-4):1245-1249.
- Huang W.**, Niu H., Gong, G.H., Lu Y.R. (2007a). Individual and combined effects of physicochemical parameters on ellagitannin acyl hydrolase and ellagic production from ellagitannin by *Aspergillus oryzae*. *Bioprocess Biosyst Eng.* **30**:281-288.

- Huang W.**, Niu H., Zhenshan L.W., Gong G., Wang W. (2007b). Effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase and cellulose on ellagic acid production from cups extract of valonia acorns. *Process Biochemistry*. **42**(9):1291-1295.
- Hyder P.**, Fredrickson E.L., Estell R.E., Lucero M.E. Remmenga M.D. (2005). Loss of phenolic compounds from leaf litter of creosotebush [*Larrea tridentata* (Sess. & Moc. ex DC.) Cov.] and tarbush (*Flourensia cernua* DC.). *J. of Arid Environments* **61**:79-91.
- Inoue** and Hagerman. (1988). Determination of gallotannin with rhodanine. *Analytical Biochemistry*. **169**: 363-369.
- Iran Daily**. (2004). Pomegranate Production Top Global Figure. Domestic economy, November 04, p3.
- Isaza J.H.**, Ito H., Yoshida T. (2004). Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry*. **65**: 359-367.
- Ito H.**, Miyake M., Nisitani E., Mori K., Hatano T., Okuda T., Konoshima T., Takasaki M., Kozuda M., Mukainaka T., Tokuda H., Nishino H., Yosida T. (1999). Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. *Cancer letters* **143**: 5-13.
- Jones, Q.** and F.E. Earle. (1966). Chemical analysis of seed II: Oil and protein content of 759 species. *Econ. Bot.* **20**(2):127.155.
- Hossein, S. A.** y R. Maldonado. (1982). Potencial de la flora de zonas áridas. *Ciencia y Tecnología*. (47):98-109.
- Kähkönen M.P.**, Hopia A.I., Heinonen M. (2001). Berry Phenolics and Their Antioxidants Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**:4076-4082
- Kaponen, J.M.** and A.M. Happonen. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (55) 1612-1619.
- Khanbabaee K.** and van Ree T. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Natural Products Reports*. **18**:641-649.
- Knudson L.** (1913). Tannic acid fermentation. *Journal of Biological and Chemistry* **14**(3): 159-184.
- Lee J-H.** and S.T. Talcott. (2002). Ellagic acid and ellagitannins affect on sedimentation in muscadine juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 3971-3976.
- Lee S-H.**, Tanaka T., Nonaka G., and Nishioka I. (2004). Structure and biogenesis of Jolkinin, a Highly Oxygenates Ellagitannin from *Euphorbia jolkinii*. *Journal of Natural Products*. **67**: 1018-1022.
- Lei Z.**, Jervis J., Helm R.F. (2001). Use of Methanolysis for the Determination of Total Ellagic and Gallic acid Contents of Wood and Food Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**:1165-1168.
- Lei Zhentian.** (2002). *Monomeric Ellagitaninins in Oaks and Sweetgum*. Doctoral dissertation. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment. April 25, Blacksburg, Virginia, U.S.A.
- Lenkha P.** and Lonsane B. (1997). Comparative titres, location and properties of tannin acyl hydrolase produce by *Aspergillus niger* PKL 104 in solid-state, liquid surface and submerged fermentations. *Process biochemistry* **29**: 497-503.
- Loredo T.A.** (2004). Producción de oligosacáridos de quitosán por vía enzimática y su capacidad fungistática en tortillas de maíz. Tesis de licenciatura. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.

- López-Guerra N.** (2006). *Tesis licenciatura*. Cambios físico-químicos de fuentes ricas en polifenoles pre y post fermentación fúngica. Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.
- Luedeking R.** and E.L. Piret. (1959). A kinetics study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.* 1(4):393–412.
- Määttä K.R.,** Kamal-Eldin A., Törrönen A.R. (2003). High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Phenolic Compounds in Berries With Diode Array and Electrospray Ionization Mass Spectrometric (MS) Detection *Ribes* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **51**: 6736-6744.
- Määttä-Riihinen K.R.,** Kamal-Eldin A., Törrönen A.R. (2004). Identification and Quantification of Phenolics Compounds of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **52**: 6178-6187.
- Machado T.deB.,** Leal I.C.R., Amaral A.C.F., dos Santos K.R.N., da Silva M.G., Kuster R.M. (2002). Antimicrobial Ellagitannin of *Punica granatum* Fruits. *Journal Brazilian of Chemistry Society.* **13**(5):606-610.
- Makkar H.P.S.,** Blümmel M., Borowy N.K., Becker K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *J. Sci. Food Agric.* 61:161-165.
- Martens-Talcott S.U.,** Talcott S.T., Percival S.S. (2003). Low Concentrations of Quercetin and Ellagic acid Synergistically Influence proliferation, Cytotoxicity and Apoptosis in MOLT-4 Human Leukemia Cells¹⁻³. *Journal of Nutrition.* 133:2669-2674.
- Martínez-Hernández J.E.** (2003). *Tesis licenciatura*. Producción de enzima tanasa a través de *Aspergillus niger* Aa-20 utilizando hojaseñ (*Flourensia cernua* D.C.) como única fuente de carbono y energía. Departamento de Nutrición y Alimentos, División de Ciencia Animal, Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Matějček D.,** Mikes O., Klejdus B., Sterbová D. (2005). Kubán, Changes in contents of phenolic compounds during maturing of barrique red wines, *Food Chemistry,* 90:781-800.
- Mercado-Martínez D.** (2006). Tesis de licenciatura. Cambios en el contenido de polifenoles presentes en plantas del semidesierto Mexicano utilizando cepas de *Aspergillus niger* y su evaluación “*in vitro*” como posible alimento para el ganado. Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Mercado D.,** Belmares R., Aguilera-Carbo A., Contreras-Esquivel J.C., Rodríguez R., Heredia N., Aguilar C.N. (2007). Toxicity *In vitro* Digestibility of Creosote Bush and Tar Bush Fermented under Fungal Solid State Culture Conditions. *Research Journal of Biological Sciences.* **2**(5):571-575.
- Methods of Analysis **AOAC.** Ed. William Horwitz. México. (1992)
- Miller G.L.** (1989). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* **31**:426-428.
- Mingshu L.,** Kai Y., Qiang He., Dongying J. (2006). Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *Journal Basic of Microbiology.* **46**(1):68-84.
- Mullen W.,** Stewart A.J., Lean M.E.J., Gardner, P., Duthie G.G., Crozier, A. (2002). Effect of Freezing and Storage on the Phenolics, Ellagitannins, Flavonoids, and Antioxidant Capacity of Red Raspberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50**:5197-5201.

- Mullen**, W., Yokota T., Lean M.E.J., Crozier A. (2003). Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry* **64**: 617-624.
- Ni X.** and D.A. Streett. (2005). Modulation of water activity on fungicide effect on *Aspergillus niger* growth in Sabouraud dextrose agar medium. *Letters in Applied Microbiology*. **41**(5):428-433.
- Niemetz R.**, Schilling G., Gross G.G. (2001). Ellagitannin biosynthesis: oxidation of pentagalloylglucosa to tellimagrandin II by an enzyme from *Tellima grandiflora* leaves. *Chemical Communications* 35-36.
- Niemetz R.** and G.G. Gross (2003). Oxidation of pentagalloylglucosa to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves. *Phytochemistry* **62**: 301-306.
- Niemetz R.** and G.G. Gross. (2005). Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* **66**: 2001-2011.
- Nierestein M.** (1915). The formation of ellagic acid form galloyl-glycine by *Penicillium*. *Biochem. J.* **9**(2):240-244.
- Nierinstein M.** and J. Procter. (1945). The distribution of myrobalanitanin. *Biochem. J.* **39**(5):390-392.
- Notka F.**, Meiel G., Wagner R. (2004). Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antiviral Research* **64**(2): 93-102.
- Official methods of analysis of AOAC International. 1998. Editado por Patricia Conniff. Publicado por AOAC International, 16th edición, volumen 1 y 2, USA.
- Ohtani I.I.**, Gotoh N., Tanaka J., Higa T., Gyamfi M.A., Aniya Y. (2000). Thonningianins A and B, New Antioxidants from the African Medicinal Herb *Thonningia sanguinea*. *Journal of Natural Products*. **63**: 676-679.
- Okuda T.**, Yoshida T., Hatano T., Ikeda Y.; Shingu T., Inoue T. (1986). Constituents of *Geranium thunbergii* SIEB. Et ZUCC. XIII. Isolation of water-soluble tannins by centrifugal partition chromatography, and biometric synthesis of elaeocarpusin. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*. **34**: 4075-4082.
- Okuda, T.**; Yosida, T.; Hatano, T. (1993). Classification of oligameric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry* **32**:507-521.
- Olsson, M. E.**; Ekvall, J.; Gustavsson, K-E.; Nilson, J.; Pillai, D.; Sjöholm, I.; Svensson, U.; Akesson, B.; Nyman M.G.L. (2004). Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52**:2490-2498.
- Osawa, R.**, Kuroiso, K., Goto, S. and Shimizu, A. (2000). Isolation of Tannin-Degrading lactobacilli from Humans and Fermented Foods. *Applied Environmental Microbiology*. **66**(7): 3093-3097.
- Parra, R.**, Aldred, D., Archer, D.B., Magan, N. (2004). Water activity, solute and temperature modify grow and spore production of wild type and genetically engineered *Aspergillus niger* strain. *Enzyme and Microbial Technology*. **35**(2-3):232-237.
- Patente:** Comisión de Patentes Europeas, Oficina Española de Patentes y Marcas, No. De publicación ES 2032899, No. de Solicitud Europea: 888109207.6. Fecha 14-12-1988.
- Pirt, S.J. (1975) Principles of microbe and cell cultivation, *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- Procter, H.R.** (1894). On the qualitative determination of tanning materials. *J. Am. Chem. Soc.*, **16**(4):247-260. DOI: 10.1021/ja02102a005.

- Przewloka**, S.R. and Shearer, B.J. (2002). The Further Chemistry of Ellagic Acid II. Ellagic Acid and Water-Soluble Ellagates as Metal Precipitants. *Holzforschung* 56: 13-19.
- Quideau**, S.; Feldman, K.S. (1996). Ellagitannin chemistry. *Chemistry Revision*. 96:475-503.
- Quideau**, S.; Feldman, K.S. (1997). Ellagitannins Chemistry. The First Synthesis of Dehydrohexahydroxydiphenolate Esters From Oxidative Coupling of Unetherified Methyl Gallate. *Journal of Organic Chemistry*. 62:8809-8813.
- Quinn**, M.K. and Singleton, V.L. (1985). Isolation and identification of ellagitannins from whit oak wood and an estimation of their roles in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 36:148-155.
- Ramirez-Coronel**, M-A., Viniestra-González, G., Darvill, A. and Augur, C. (2003). A novel tannase from *Aspergillus niger* with β -glucosidase activity. *Mycobiology*. 149:2941-2946.
- Robledo-Olivo**, A. (2007). Obtención de ácido elágico mediante la degradación fúngica de elagitaninos en cultivo en medio sólido. *Tesis de Maestría* Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, Coahuila, México.
- Ruibal**, B.I.J., Marta Dubed E.M., Martínez F.L., Noa R.E., Vargas G.L.M., y Santana R.J.L. (2003). Inhibición de la replicación del virus de Inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus Caribaea* Moret. *Revista Cubana de Farmacia*. 37(2): 1-8.
- Saavedra**, P.A.G., Couri, S., Ferreira, L.S.G. and Sousa, de B.E. (2005). Tanase: Conceitos, Produção e Aplicação. *B.CEPPA, Curitiba*. 23(2): 435-462.
- Salminen**, J-P., Roslin, T., Karonen, M., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., Pulkkinen, P. (2004). Seasonal variation in the content of hydrolyzable tannins, flavonoid glycosides, and proanthocyanidins in oak leaves. *J. of Chemical Ecology*. 30(9):1693-1711.
- Sánchez-Alvarado**, E.E. (2001). Aplicación y usos potenciales de la tanasa y los taninos. Monografía de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, México.
- Scalbert**, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30:3875-3883.
- Scalbert**, A.; Duval, L.; Peng, S.; Monties, B. (1990). Polyphenols of *Quercus robur* L. II. Preparative Isolation by Low-Pressure and High-Pressure Liquid Chromatography of Heartwood Ellagitannin. *Journal of Chromatography*. 502: 107-119.
- Seeram**, N. and Heber D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum L.*) juice. *Clinical Chimica Acta*. 348: 63-68.
- Seeram**, N.; Lee, R.; Hardy M. and Heber D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*. 41: 49-55.
- Sherve** F. and Wiggins I.L. (1964). Vegetation and Flora of the Sonora-Desert. Stanford University Press, copia 1. pp. 165-167.
- Shi**, B.; He Q.; Yao K.; Huang W. and Li Q. (2005). Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80: 1154-1159.
- SIACON** (2006). Sistema de información agroalimentaria de consulta. (http://www.oedrus-tamaulipas.gob.mx/cd_anuario_06/SIACON_2007.html)

- Silva, S.R.E.** (1980). Tesis Licenciatura. Estado Actual de los Recursos Naturales Renovables de los Ejidos el Prado, Municipio de Galeana, Nuevo León, México. Facultad de Biología UANL. Monterrey, N. L., México. 75p.
- Silva, O.;** Duarte, A.; Pimentel, M.; Viegas, S.; Barroso, H.; Machado, J.; Pires, I.; Cabrita, J.; Gomes E. (1997). Antibacterial Activity of *Treminalia macroptera* root. *Journal of Ethnopharmacology*. **57**: 203-207.
- Siller, S.M.I.** (1980). *Tesis licenciatura*. Datos Ecológicos de las áreas salinas del Valle de Santa Rita y el Ejido el Prado, Municipio de Galeana, Nuevo León, México. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, N. L. 73 p.
- Sharma, S.;** Bhat, T.K.; Dawra, R.K. (2000). A spectrophotometric Method for assay of tannase using rhodanine. *Analytical biochemistry*. **279**:85-89.
- Spencer, C.M.;** Cai, Y.; Martín R.; Gaffney, S.H.; Goulding, P.N.; Magnolato, D.; Lilley T.H. and Haslam, E. (1988). Polyphenol complication – some thoughts and observations. *Phytochemistry* **27**: 2397-2409.
- Sporne, K.R.** (1975). A note of ellagitannins as indicators of evolutionary status in dycotiledons. *New phytol.* **75**:613-618.
- Swain, T.** and Bate-Smith, E. C. (1962). Flavonoid compounds. In M. Florkin & H. S. Mason (Eds.), *Comparative biochemist, a comprehensive treaty*, Vol. III: constituents of life part A (pp. 755±809). New York: Academic Press.
- Switzer, M.** and van Keuren M.L. (1979) Trace polypeptides in a cellular extract and human body fluids by two- dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc Natl Acad Sci.* **76**(9):4335-4339
- Tan, G.H.;** Pezuto, J.M.; Kinghorn, A.D. (1991). Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *Journal of Natural Products.* **54**:143-154.
- Tatsuo, K.;** Mitsuhiko, N.; Mokoto, I.; Yukio, O.; Yosisada, Y. Nobuo, O. (1998). Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. *Planta Medical.* **64**:27-30.
- Treviño-Cueto, B.E.** (2006). *Tesis Maestría*. Obtención de ácido gálgico y tanasa a partir de gobernadora (*Larrea tridentata*): Estudios básicos. Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.
- Uchiumi, F.;** Hatano, F.; Ito, H.; Yoshida T.; Tanuma, S-I. (2003). Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. *Antiviral Research.* **58**(1):89-98.
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program.** *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?21509> (23 November 2008).
- Vaquero, I.;** Marcobal, A. and Muñoz, R. (2004). Tannase activity by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology.* **96**:199-204.
- Vattem, D.A.** and Shetty K. (2002). Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporum*. *Food Biotechnology.* **16**(3): 189-210.
- Vattem, D.A.** and Shetty K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidants activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpo*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry* **39**:367-379.
- Ventura, J.;** Belmares, R., Aguilera-Carbo, A.F., Gutiérrez-Sanchez, G., Radríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N., (2008). Fungal Biodegradation of Tannins from Creosote

- Bush (*Larrea tridentata*) and Tar Bush (*Fluorensia cenua*) for Gallic and Ellagic acid production. *Food Technol. Biotechnol.* **46**(2):213-217.
- Viriot, C.**; Scalbert, A.; Herve du Penhoat, C.L.M.; Moutounet, M. (1994). Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut. Dimerization and hydrolysis during wood aging. *Phytochemistry.* **36**:1253-1260.
- Vivas, N.**; Laguerre, M.; Pianet de Boissel, I. Vivas de Gaulejac, N.; Nonier M-F. (2004). Conformational Interpretation of Vascalagina and Castalagin Physicochemical Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **52**: 2073-2078.
- Viniegra-González G.** (2003). Producción de enzimas por *Aspergillus*. *BioTecnología. Nueva era.* Mayo-agosto 8(2).
- Vines, R.A.** (1960). Threes Shurbs and Woddy Vines of the South West. University of Texas Press. Austin, Texas, 1104 p.
- Wada, L.** and Ou, B. (2002). Antioxidant Activity and Phenolic Conten of Oregon Caneberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **50**: 3495-3500.
- Wang, C.C.**; Chen, L.G.; Yang, L.L. (1999). Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea Hyssopifolia*. *Cancer letters.* **140**:195-200.
- Wilson, T.C** and A.E. Hagerman. (1990). Ellagitannins in plant are hydrolyzed to release ellagic acid, which forms a colored product upon reaction with nitrous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **38**: 1678-1683.
- Yoshida, T.**; Amakura, Y.; Koyura, N.; Ito, H.; Isaza, J.H.; Ramírez, S.; Peláez D.P.; Renner, S.S. (1999). Oligomeric hydrolysable tannins from *Tibouchina multiflora*. *Phytochemistry.* **52**: 1661-1666
- Zhang, Y-J.**; Abe, T.; Tanaka, T.; Yang, C-R.; Kouna, I. (2001). Phyllanemblinins A-F, New Ellagitannins from *Phyllanthus emblica*. *Journal of Natural Products.* **64**: 1527-1532.



11. Apéndices

Apéndice A

Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins

Antonio Aguilera-Carbo · Christopher Augur ·
Lilia A. Prado-Barragan · Ernesto Favela-Torres ·
Cristóbal N. Aguilar

Received: 1 November 2007 / Accepted: 5 November 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract In the last years, tannin biodegradation has been the subject of a lot of studies due to its commercial importance and scientific relevance. Tannins are molecules of low biodegradation and represent the main chemical group of natural anti-microbials occurring in the plants. Among the different kinds of tannins, ellagitannins represent the group less studied mainly due to their diversity and chemical complexity. The general outline of this work includes information on tannins, their classification and properties, biodegradation, ellagic acid production, and potential applications. In addition, it describes molecular, catalytic, and functional information. Special attention has been focused on the biodegradation of ellagitannins describing the possible role of microbial enzymes in the production of ellagic acid.

Keywords Ellagitannins · Ellagic acid · Biodegradation

A. Aguilera-Carbo · L. A. Prado-Barragan ·
E. Favela-Torres
Department of Biotechnology,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa 09340 DF, México

C. Augur
IRD-Unité Biotrans; IMEP Case 441;
Faculté des Sciences de Saint Jérôme, Université Paul Cézanne,
Av. Escadrille Normandie-Niemen,
13397 Marseille cedex 20, France

C. N. Aguilar (✉)
Food Research Department, School of Chemistry,
Universidad Autónoma de Coahuila,
25280 Saltillo, Coahuila, México
e-mail: cag13761@mail.uadec.mx

Introduction

Tannins are natural compounds widely distributed in the plant kingdom. These compounds are present in roots, leaves, fruits and seeds. The function of tannins is the defense system of plants against microbial and animal attacks due to their astringent capacity and the ability to form complexes with proteins and polysaccharides (Swain and Bate-Smith 1962). Tannins are a complex family of polyphenolic compounds, water-soluble, with molecular weights between 500 and 3,000 Da (Lekha and Lonsane 1997). However, these molecular weight values change when they are polymerized to form condensed or hydrolysable tannins reaching values close to 40,000 Da (Spencer et al. 1988; Khanbabaee and van Ree 2001). Tannins are secondary metabolites of plants (Bhat et al. 1998). It is generally accepted that considering their sugar content, polymerization and esterification degrees they are divided in three groups: condensed tannins, hydrolysable tannins and complex tannins. However, recently a further breakdown into four groups was proposed: condensed tannins, complex tannins, gallotannins, and ellagitannins (Khanbabaee and van Ree 2001).

Condensed tannins are polymers of flavan-3 ol or flavan-3,4-diol that do not contain sugar residues (Lekha and Lonsane 1997). They are known as polymeric proanthocyanidins and leucoanthocyanidins based on flavan units, mainly catechin or epicatechin. A typical condensed tannin can be represented by the dimer of proanthocyanidins linked to flavan units. To date, condensed tannins of high molecular weight have not been recovered and purified. Oligomers and polymers of low molecular weight have however been characterized. Their carbon-carbon linkages are not susceptible to formation of new linkages after their hydrolysis (Garro et al. 1997).

Complex tannins are those compounds resulting from the linking of catechins or epicatechins with gallic or ellagic acids due to reactions catalyzed by light, heat, and oxygen. A typical mixed tannin is catechin gallate, containing hydrolysable and condensed moieties.

Gallotannins are hydrolysable tannins formed from galloyl units linked to a glucosidic core (Khanbabae and van Ree 2001). Gallotannins are polyphenols susceptible to hydrolysis by enzymes (tannase activity), acids or alkalis (Huang et al. 2005). A typical gallotannin is tannic acid, molecule formed by a central glucose moiety and five (pantagalloyl glucose) to nine (nanogalloyl glucose) galloyl residues (Belmares-Cerda et al. 2004). It is important to note that to be considered as hydrolysable, a tannin molecule must have at least three galloyl radicals esterified with a polyol (Sánchez-Alvarado 2001).

Ellagitannins contain a group hexahydroxydiphenic acid (HHDP), which after hydrolysis is dehydrated followed by spontaneous lactonization forming ellagic acid (Fig. 1). Monophenols derived from tannins are an important group of molecules with interesting biological activities, among which are gallic, ellagic, quinic, caffeic, and ferulic acids.

Physiological properties of tannins

Tannins are located in vacuoles of intact plant cells, and are released upon attack by diverse microorganisms, including viruses, bacteria, and fungi, thereby avoiding potential infection of plant tissues (Field and Lettinga 1992a; Silva et al. 1997). In addition, the astringent properties of tannins

stop the infestation of insects (Goldstein and Swain 1965). In addition, tannins offer protection against ruminants due to the formation of complexes between plant tannins and animal proteins such as hydroxyproline-rich proteins. Formation of such complexes results in a bitter and disagreeable sensation which deters potential predators (Edelmann and Lendi 2002). Molecules present in the plants that are susceptible to microbial degradation, such as proteins and polysaccharides, have evolved to become highly resistant to such degradation when linked to tannins (Betnoit et al. 1968; Aguilar and Gutierrez-Sanchez 2001).

Tannins act as growth inhibitors towards many microorganisms including bacteria, yeasts, and fungi. They are therefore recalcitrant to enzyme degradation by most microorganisms (Field and Lettinga 1992b; Silva et al. 1997). Condensed tannins are more resistant to microbial attack than hydrolysable tannins and are more toxic for foodborne pathogens (Aguilera-Carbo et al. 2005). Scalbert (1991) reported that tannins retard the decomposition of solid organic material through inhibition of degrading enzymes of attacking microorganisms. When tannins are complexed with microbial proteins or polysaccharides, the interactions formed are often irreversible, and this characteristic confers bactericide and bacteriostatic properties. However, some microorganisms tolerate the presence of tannins and/or use these compounds as carbon source (Knudson 1913; Deschamps et al. 1983; Field and Lettinga 1992b; Cruz-Hernández et al. 2005, 2006). That ability is generated by the production of a tannin-degrading enzyme or tannase, produced mainly by microorganisms of the genus *Aspergillus* and *Penicillium* (Belmares-Cerda et al. 2004; Aguilar et al. 2007a, b).

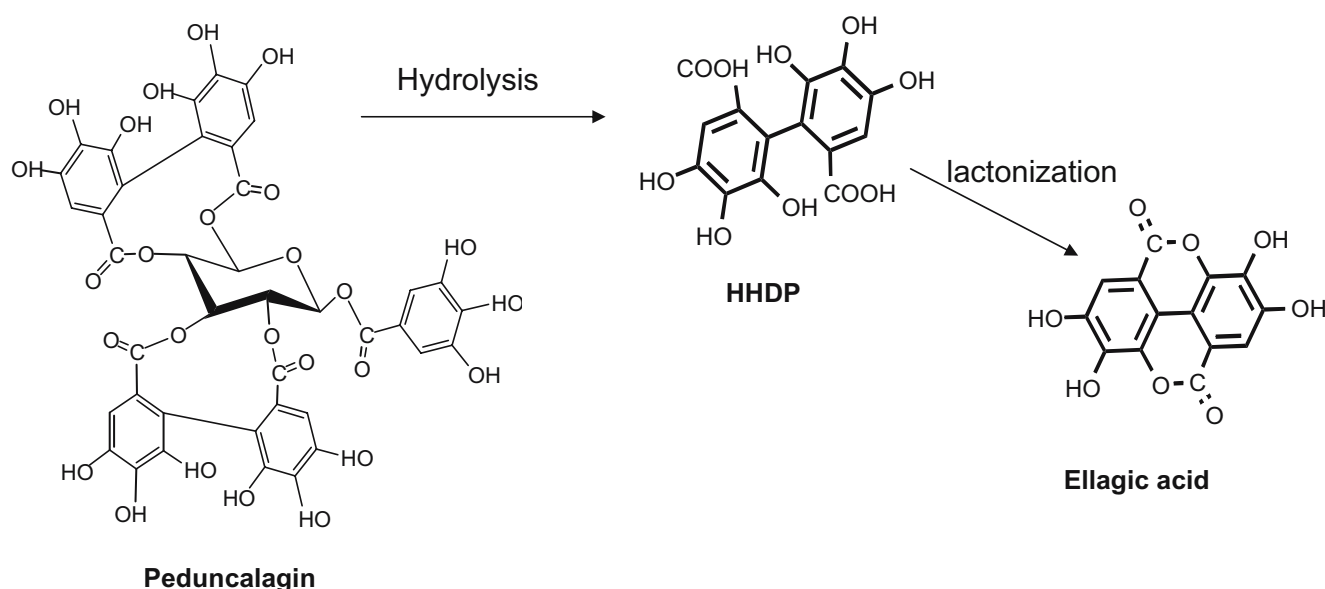


Fig. 1 Scheme of enzymatic hydrolysis of an ellagitannin to produce ellagic acid by a microbial conversion

Ellagitannins biosynthesis

The compound widely accepted as the major precursor of ellagitannins in plants is 1,2,3,4,6,-penta-*O*-galloyl-*b*-*D*-glucose (PPG), (Niemetz et al. 2001). The metabolic pathway for production of these compounds has been elucidated. The oxidation of PGG is carried out enzymatically by a polyphenoloxidase (laccase) catalyzing the formation of hexahydroxydiphenic acid (HHDP) *in situ* (Niemetz and Gross 2003, 2005).

Enzyme studies have shown that the biosynthesis of 1,2,3,4,6-pentagalloyl- β -*D*-glucose, the common and immediate precursor of the two sub-classes of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins), involves a series of highly position-specific galloyltransferase reactions which depend on β -glucogallin (1-*O*-galloyl- β -*D*-glucose) as principal acyl donor. This mechanism applies also to the subsequent addition of galloyl groups to pentagalloylglucose, yielding complex gallotannins characterized by meta-digalloyl residues (Hoffmann and Gross 1990).

Studies with cell-free extracts from sumac (*Rhus typhina*) leaves revealed the existence of several isoenzymes that catalyzed the *in vitro* acylation of pentagalloylglucose. Among these, three galloyltransferases (A, B, and C) were isolated and separated according to their different molecular weights. Galloyltransferase C has been purified to apparent homogeneity and consisted of four identical subunits converting pentagalloylglucose to the gallotannins and ellagitannins (Niemetz and Gross 2003). Galloyltransferases A and B were found to preferentially form polygalloylglucoses. It is thus evident that galloyltransferases A and B promote substitution at positions 2 and 4 of the pentagalloylglucose core, while transferase C is specific for the acylation of position 3.

Ellagitannins and ellagic acid

Ellagitannins and ellagic acid have been studied mainly for their positive effect on human health and for their physiological properties such as anti-tumoural (Feldman et al. 1999; Ito et al. 1999; Wang et al. 1999; Talcott et al. 2003), anti-peroxidating (Okuda et al. 1993), anti-viral (Uchiumi et al. 2003; Ruibal et al. 2003; Notka et al. 2004), anti-oxidant (Tan et al. 1991; Da Porto et al. 2000; Gil et al. 2000; Anderson et al. 2001; Vatterm and Shetty 2003; Fukuda et al. 2003; Olsson et al. 2004), anti-foodborn pathogens (Aguilera-Carbo et al. 2005), and the anti-mutagenic (Tatsuo et al. 1999) activities. Furthermore, ellagitannins are considered as activators of glucose transport (Hayashi et al. 2002), and chelating agents of metals. Industrially, ellagitannins and ellagic acid are used

in creams, eau de toilette and other cosmetic products which have a clearing effect of the skin (Patent CPE: 88109207.6). However, in the food industry these compounds have not been approached.

Ellagitannins can be classified according to the number of HHDP groups present in the molecule (Quideau and Feldman 1996) as well as the different monomeric structures that then make up the oligomers and polymers (Fig. 2).

Ellagic acid is a dilactone of the hexahydroxydiphenic acid with a molecular weight of 338.2 g/mol. It is highly thermostable due to the four rings of the molecule (Fig. 1), which represent lipophilic dominance, and the four phenolic groups and the two lactones representing the hydrophilic zone (Bala et al. 2006). These properties of ellagic acid result in high water insolubility. However, it is soluble in acidified methanol (Lei 2002), ethanol (Shi et al. 2005), and dimethyl sulfoxide (Bala et al. 2006).

Monomeric ellagitannins are comprised of a sole HHDP group linked to a glucosidic core. Carbon-carbon oxidative linkage between galloyl groups generates HHDP transforming PGG into a monomeric ellagitannin (Haslam and Cai 1994). Generally, the linked carbons in the galloyl groups are in positions C2-C3, and C4-C6 of the glucose molecule. Furthermore, the linked carbons can correspond to carbons presents in galloyl radicals located in C1-C6, C3-C6 and C2-C4 of the glucose core. These different bonding capacities confer structural complexity to monomeric ellagitannins. In addition, complexity reaches higher levels of galloylation and stereochemistry of the HHDP groups (Haslam and Cai 1994; Quideau and Feldman 1997; Lei 2002). Notable ellagitannins present in plants are 4,6-HHDP and 2,3-HHDP. Typical 4,6-HHDP monomeric ellagitannins are the tellimagradin II, Strictin, and Tellimagradin I (Fig. 2); typical 2,3-HHDP monomeric ellagitannins are the pterocaryanin C, sanguine H5 and H4, Mixtures of 4,6-HHDP and 2,3-HHDP ellagitannins are casuarictin, potentillin, and pedunculagin (Lei 2002). Other significant groups of monomeric ellagitannins are formed by acyclic aromatic glucosides represented by vascalagin and castalagin, which are characterized by the presence of a flavogalloyl group with three linked galloyl groups (Quinn and Singleton 1985; Virot et al. 1994).

Monomeric ellagitannins can polymerized to form oligomeric and polymeric ellagitannins. Polymerization is the result of the oxidative linkage C-O between galloyl groups and HHDP with galloyl groups (Quideau and Feldman 1996; Zhang et al. 2001). Typical oligomeric ellagitannins are vascalagin and/or castalagin: roburin A and Roburin D (Quideau and Feldman 1996, 1997; Zhang et al. 2001; Lei 2002).

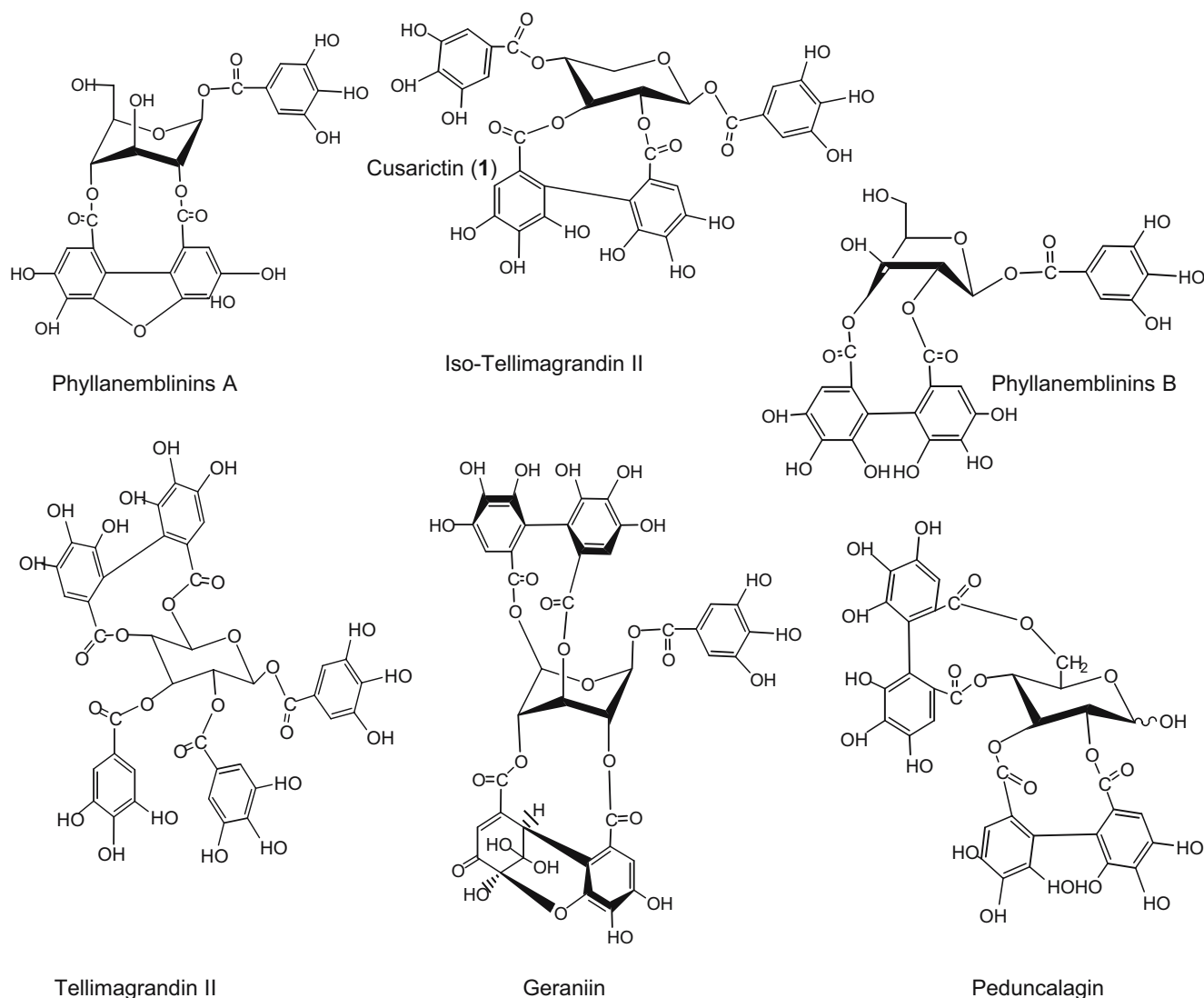


Fig. 2 Typical monomeric and dimeric ellagitannins

Sources of ellagitannins

There are more than 500 different reported structures of ellagitannins (Feldman et al. 1999). Table 1 presents some typical ellagitannins and their natural sources. Shrubby trees are excellent sources of ellagitannins. El-Toumy et al. (2001) have reported several ellagitannins obtained and characterized from *Punica granatum* among which are: ellagic acid-4-*o*- α -L-rhamnopyranose, 6-*o*-galloyl-(α/β)-D-glucopyranose, 6-*o*-galloyl-2,3-*S*-hexahydroxyphenoyl-(α/β)-D-glucopyranose, coralagin, 3,3'-di-*o*-methyl ellagic acid, 3'-*o*-methyl-3,4-methylenedioxy ellagic acid. El-Toumy and Rauwald (2002) reported the punicacortein D, punicalin, punicalagin, 2-*O*-galloylpunicalin and two new ellagitannins, diellagic acid rhamnosyl (1–4) glucopyranose and 5-galloylpunicacortein D.

Ellagitannins and ellagic acid are consumed constantly in fruit, seeds, and in the foods or beverages based on fruit

juices and jams, etc. (Clifford and Scalbert 2000). High contents of ellagitannins and ellagic acid have been reported in strawberry, cranberry, blueberry, and blackberry (Constantin 1997; Kähkönen et al. 2001; Lei et al. 2001; Mullen et al. 2002; Wada and Ou 2002; Vatter and Shetty 2003; Määttä-Riihinen et al. 2004; Kaponen et al. 2007). In addition, their presence has been reported in pecans, nuts, some roots, and pomegranates (Table 2).

Extraction, characterization, and quantification

It is important to apply the best techniques for extraction of ellagitannins and ellagic acid. The key step of the extraction process is the selection of the solvents and their mixtures. Better results have been found using methanol/water or acetone/water. Lei (2002) reported a comparison of those mixtures and concluded that the mixture of acetone/water in

Table 1 Sources of main ellagitannins

Ellagitannins	Fuente vegetal	References
Vascalagin, castalgin and valonea	<i>Quercus</i> sp.	Lei et al. 2001, Huang et al. 2005
Nobotanins G, K, P,Q, R,S and T; brediatin B, nobotanin A, B, F, β -glucogallin, pedunculagin,, 4-6-(S)-HHDP-glucopyranose, malabathrin D, pterocaryanin C, (1,4,6-O-trigaloyl-2,3-O-HHDP- β -D-glucose), Casuarictin (1-O-galloyl-2,3/4,6-O-bisHHDP- β -D-glucose)	<i>Monochaetum multiflorum</i>	Isaza et al. 2004
Nobotanins O and P, Stachyurin, Casuarinin, Madinillin B, Nobotanins A, B, D, F, G, J and M, Pedunculagin, Casuarictin	<i>Tibouchina multiflora</i>	Yoshida et al. 1999
Thonningianins A and B	<i>Thonningia sanguinea</i>	Ohtani et al. 2000, Mullen et al. 2003
Ellagic acid -4-arabinose, Sanguiin H-6, Sanguiin H-10, Lambertianin C, ellagic acid-4-acethylxylosa, ellagic acid-4-acethylarabinose	<i>Rubus</i> sp.	
Jolkinnin, Geraniin, Corilagin, Carpinusin, Putranjivain, Helioscopinin B, Helioscopinin A	<i>Euphorbia jolkinii</i>	Lee et al. 2004, Chen et al. 1999,
Cuphiins D ₁ and D ₂ , Woodfordin C, Miryccitrin, Tellimagrandin II, Oenothien B	<i>Cuphea hyssopifolia</i>	Zhang et al. 2001
Phyllanemblinins A, B and F, Corilagin, 1-(β),2,3,6-tetra-O-galloylglucose, Chebulanin, chebulagic acid, Elaeo-carpusin, punicafolin, tercatain, mallonin, Putranjivain A	<i>Phyllanthus emblica</i>	
Ellagic acid 4-O- α -l-rhamnopyranose, 6-O-galoil-(α/β)-d-glucopyranose, 6-O-galoyl-2,3-S-haxahydroxyphenoyl-(α/β)-d-glucopyranose, coralagin, 3,3'-di-O-methyl ellagic acid, 3'-O-methyl-3,4-methylendioxy ellagic acid. puniacortein D, punicalin, punicalagin, 2-O-galloylpunicalin, diellagic acid rhamnosyl (1-4) glucopyranose y 5-galloylpuniacortein D	<i>Punica granatum</i>	El-Toumy et al. 2001, El-Toumy and Rauwald 2002, Machado et al. 2001, Seeram et al. 2005

The key biosynthesis way is the 1,2,3,4,6,-penta-O-galloyl- β -D-glucose formation.

Table 2 Ellagitannins-rich plants of economical importance used as foods

Family	Latin name	Common name
<i>Anacardiaceae</i>	<i>Anacardium occidentale</i>	Cashew
	<i>Pistacio vera</i>	Pistachio nut
	<i>Mangifera indica</i>	Mango
<i>Betulaceae</i>	<i>Corylus avellana</i>	Hazelnut
<i>Ebenaceae</i>	<i>Diospyros kaki</i>	Persimmon
<i>Fagaceae</i>	<i>Castanea sativa</i>	Chestnut
<i>Juglandaceae</i>	<i>Juglans regia</i>	Nut
<i>Myrtaceae</i>	<i>Psidium guajava</i>	Guava tree
	<i>Eugenia caryophyllata</i>	Clove
	<i>Pimenta officinalis</i>	Green pepper
<i>Punicaceae</i>	<i>Punica granatum</i>	Pomegranate
<i>Rosaceae</i>	<i>Prunus domestica</i>	Plum
	<i>Prunus armeniaca</i>	apricot
	<i>Prunus persica</i>	Peach
	<i>Prunus avium</i>	Wild cherry
	<i>Fragaria spp</i>	Strawberry
	<i>Rubus idaeus</i>	Raspberry
	<i>Rubus fruticosus</i>	Blacberry bush
	<i>Ribes nigrum</i>	Blackcurrant
	<i>Ribes rubrum</i>	Redcurrant
	<i>Ribes grossularia</i>	Wild currant
<i>Theaceae</i>	<i>Camelia sinensis</i>	Te
<i>Vitaceae</i>	<i>Vitis vinifera</i>	Grape
	<i>Vitis rotundifolia</i>	wine grape (moscatel)

Source: Clifford and Scalbert (2000)

a 7:3 ratio was the best condition where the highest yields were reached. It is important to use a temperature of 60°C and avoid light during the extraction process with constant agitation. The amount of dried sample recommended is a gram per 10 ml of solvent.

After 12 or 24 h of extraction, samples should be filtered to remove contaminants such as fibers, pigments, and other compounds. S and then solvent is then removed by evaporation. The obtained aqueous extract is frozen and lyophilized to produce the dry sample, which is considered as total polyphenols. From this sample fractionation of different tannins is carried out depending on the techniques and equipment available. For this reason, it is important to review the methods to quantify ellagitannins.

First methodologies used for ellagitannin quantification were based on the capacity of tannins to form complexes with proteins; however, these methods are very unspecific. Spectrophotometric assays were developed generally using as the key reactants potassium iodate, pyridine, sodium nitrate, and methanolysis (Wilson and Hagerman 1990; Lei et al. 2001; Hartzfel et al. 2002).

Chromatographic methods used to quantify ellagitannins and ellagic acid include high performance liquid chromatography (HPLC) thin layer chromatography (TLC) and electrophoresis chromatography (EC). The last one shows low reproducibility. However, it is easy to

carry out and enables purification of ellagitannins (Ferrerres et al. 1994; Andrade et al. 1997). In the case of TLC, it has not been considered a quantification techniques. Nevertheless, the presence or absence of some particular compounds can be carried out (Lei 2002; Machado et al. 2002).

HPLC is the most adequate (but most expensive) tool for separation and quantification of ellagitannins. Several methodologies have been reported (Okuda et al. 1986; Scalbert et al. 1990; Bianco et al. 1998; Häkkinen et al. 1998; Doussot et al. 2000; Lei et al. 2001; Lee and Talcott 2002). Exact and meticulous HPLC analysis has a critical point and several advantages. It is important to consider the kind or sample, its nature and solubility. Most techniques have focused on the run conditions on HPLC with deficiencies in the extraction conditions and on sample pre-treatment.

The best way to define the qualitative composition of ellagitannins is using mass spectrophotometry (MSⁿ; Mullen et al. 2003; Määttä et al. 2003) and nuclear magnetic resonance (NMR; Lee and Talcott 2005), tools which have given most of the detailed insight on ellagitannins reported until today.

Biodegradation of ellagitannins and ellagic acid production

Nowadays, numerous studies have been carried out on gallotannin biodegradation and have gained great success in further utilization (Bhat et al. 1998). Some of the industrial applications of these findings are in the production of tannase, the biotransformation of tannic acid to gallic acid or pyrogallol, and detannification of food and

fodder. Although ellagitannins have the typical C–C bound, which is more difficult to degrade than gallotannins, concerted efforts are still in progress to improve ellagitannin degradation and utilization (Li et al. 2006). In recent years, more attention is mainly focused on intestinal microflora biodegradation of tannins especially ellagitannins that can contribute to the definition of their bioavailability for both human beings and ruminants (Goel et al. 2005). Furthermore, there have been endeavors to utilize the tannin-degrading activity of different fungi for ellagitannin-rich biomass, which will facilitate application of tannin-degrading enzymes in strategies for improving industrial and livestock production. Table 3 presents a list of microorganisms and ellagitannin-rich materials used to produce ellagic acid.

Due to the complicated structures of complex tannins and condensed tannins, their biodegradation is much more difficult with little work carried out (Bhat et al. 1998). Therefore, major emphasis on the mechanisms of gallotannin and ellagitannin biodegradation is needed for an overall understanding of the biodegradation of complex tannins and condensed tannins. Biodegradation of tannins is in an incipient stage and further studies have to be carried out to exploit the potential of various tannins for largescale applications in food, fodder, medicine, and tannery effluent treatment (Li et al. 2006).

Several studies have reported the biodegradation of tannins (gallotannins) to produce the antioxidant gallic acid (Aguilar et al. 2007a, b). This bioprocess includes the use of microbial cultures to induce the biosynthesis of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) generally referred to as tannase, an esterase which hydrolyses ester bonds present in tannins (Aguilar and Gutierrez-Sanchez 2001). However, in the particular case of ellagitannins, the information is

Table 3 Microorganisms and ellagitannins-rich materials used for ellagic acid production

Microorganism	Culture system	Sources of Ellagitannins	References
<i>Lentinus edodes</i>	SSF	Cranberry pomace	Zheng and Shetty 2000, Vatterm and Shetty 2003
<i>Rhizopus oligosporus</i>	SSF	Cranberry pomace	Vatterm and Shetty 2002
<i>Aspergillus niger/Candida utilis</i>	Co-culture/SmF	Fruit shell of <i>Quercus aegilops</i> (valonea)	Shi et al. 2005
<i>Aspergillus</i> SHL 6	SmF	Fruit shell of <i>Quercus aegilops</i> (valonea)	Huang et al. 2005
<i>Aspergillus niger</i> GH1	SSF	Pomegranate husk	Robledo-Olivo et al. 2006, Aguilera-Carbo et al. 2007
<i>Aspergillus oryzae</i>	SmF	Acorn fringe	Huang et al. 2007a
<i>Aspergillus oryzae/Trichoderma reesei</i>	SmF	Acorn cups	Huang et al. 2007b, c
<i>Aspergillus niger</i> PSH	SSF	Leaves of creosote bush (<i>Larrea tridentata</i>) and tar bush (<i>Flourenca cernua</i>)	Ventura et al. 2007
<i>Aspergillus niger</i> GH1	SSF	Leaves of creosote bush (<i>Larrea tridentata</i>)	Aguilar et al. 2007a

scarce and confusing (Scalbert et al. 1990; Vivas et al. 2004), mainly due to their chemical complexity and diversity of kinds of ellagitannins.

Saavedra et al. (2005) reported that the production of ellagic acid has not been explored due to its high production cost and the great amount of by-products generated as a result of ellagitannin biodegradation, which results in serious problems related to recovery and purification of ellagic acid.

Until now, the study of ellagitannin degradation using biological methods (enzymatic or microbial) is emerging as a promising and fascinating topic (Huang et al. 2005, 2007a, b, c, d; Robledo-Olivo et al. 2006; Aguilera-Carbo et al. 2007). Published works on this topic have focused on ellagic acid production mentioning of the enzymes involved. However, it is known that the selective hydrolysis of galloyl groups of the ellagitannin phyllanthin is catalyzed by tannase (Zhang et al. 2001). Yoshida et al. (1999) reported the production of nobotannin K from complex ellagitannins through catalysis of tannase; however, the biochemical mechanism was not clearly explained.

Figure 3 shows a summarized ellagitannin biodegradation pathway which highlights the lack of information regarding the first enzymes involved in the primary stages of hydrolysis of ellagitannins and also about the conditions of lactonization of ellagic acid. Until today, both points have not been clearly described. The rest of the biodegradation pathway has been well studied and described (Bhat et al. 1998; Li et al. 2006).

Vattem and Shetty (2002, 2003) reported on ellagic acid production from cranberry pomace fermented by a solid state culture using *Lentinus edodes*, attributing the catalysis to the enzyme β -glucosidase, Huang et al. (2005) presented valonea tannin hydrolase as responsible for the biodegradation of valonea tannins. Nevertheless, this enzyme is itself a tannin acyl hydrolase.

Li et al. (2006) erroneously reported in their review that Vaquero et al. (2004) published that the tannin acyl hydrolase produced by species of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Pediococcus* hydrolysed gallotannins, ellagitannins, and condensed tannins present in muscadine

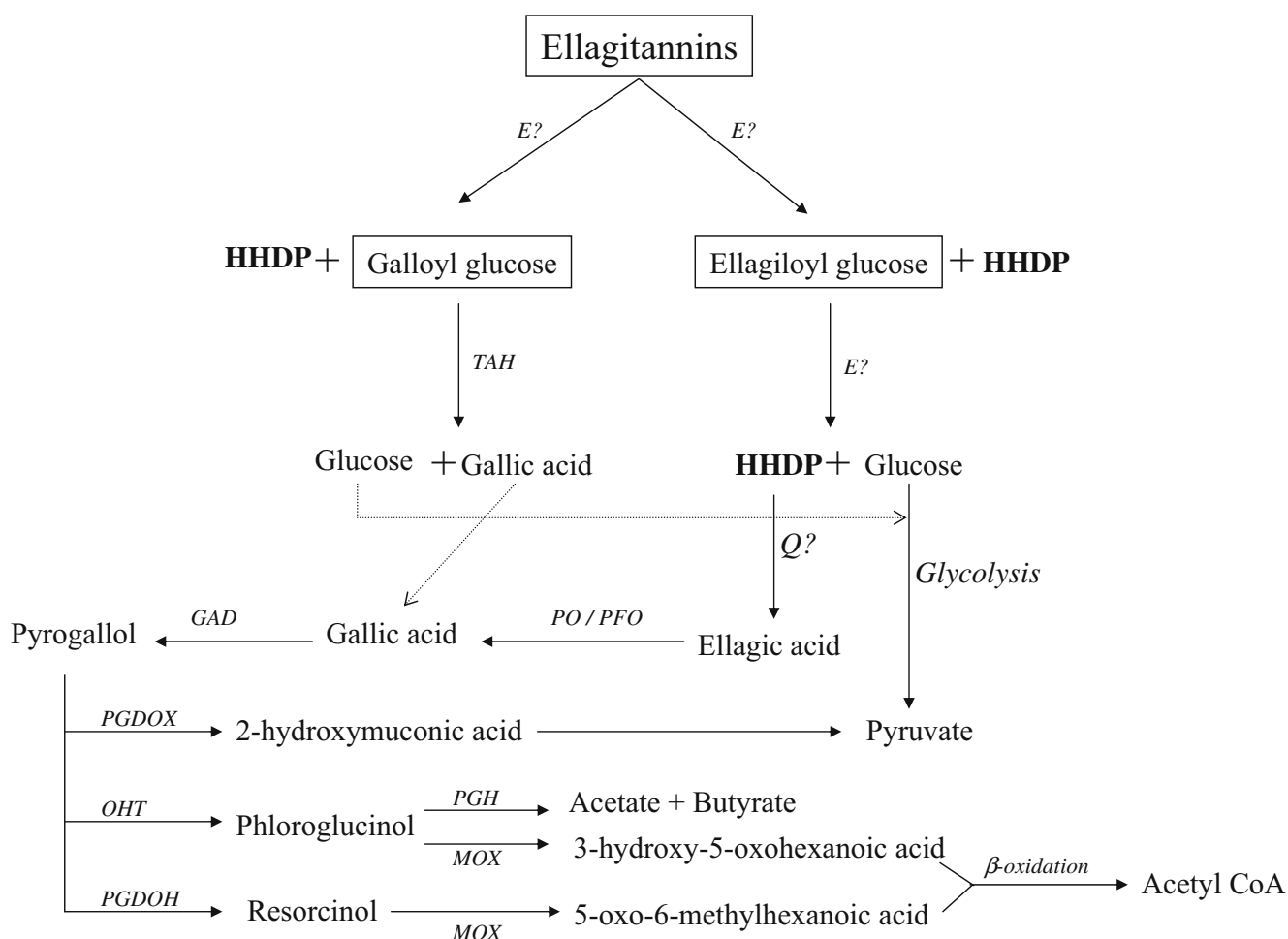


Fig. 3 Scheme of biodegradation of ellagitannins. *E?*, unknown enzymes; *TAH*, tannin acyl hydrolase; *PO*, peroxidase; *PFO*, polyphenoloxidase; *GAD*, gallic acid decarboxylase; *PGDOX*, pyro-

galloldioxygenase; *OHT*, hydroxyltransferase; *PGDOH*, pyrogalloldioxygenase; *PGH*, phloroglucinol hydrolase; *MOX*, monooxygenase; *Q?*, the lactonization is spontaneous or enzymatically catalyzed

grapes. Actually, Vaquero et al. (2004) only considered tannase production by lactobacilli without evaluation of ellagic acid released from ellagitannins.

With regards to the chemical nature of ellagitannins, glucosidase activity reported by Vatterm and Shetty (2003) and Ramirez-Coronel et al. (2003) could be associated with ellagitannin biodegradation. To corroborate such a statement, Lee and Talcott (2005), incubated ellagitannins from muscadine grape seeds with commercial tannase and α -glucosidase. They found no activity with tannase, while α -glucosidase showed high reactivity to ellagitannins. However, these reports are not enough to know in a precise manner the biodegradation of ellagitannins.

Aguilera-Carbo et al. (2007) reported on the ellagic acid production by fungal solid state culture using polyurethane foam (PUF) as support and an aqueous extract obtained from pomegranate husk (*Punica granatum*) as carbon and energy source. In that study *Aspergillus niger* GH1 was able to consume ellagitannins during the first 36 h of culture with a maximum ellagic acid concentration reached at 48 h. This study demonstrated the feasibility of ellagic acid production through biotechnology. The authors attributed ellagitannin biodegradation to a new tannase, which is probably different from tannin acyl hydrolase. This hypothesis was recently supported by Huang et al. (2007a, d) in their study of individual and interactive effects of physicochemical parameters in ellagitannin acyl hydrolase activity and ellagic acid production by *Aspergillus oryzae* using ellagitannins from acorn fringe of oak as substrate and during the evaluation of effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase, and cellulase on ellagic acid accumulation from cup extract of valonea acorns.

The most attractive results in microbial ellagic acid production have been reported by the group of Huang in China using a co-culture of *Aspergillus oryzae* and *Trichoderma reesei* employing as source of ellagic acid acorn cups extract containing up to 62% ellagitannins (Huang et al. 2007b, d).

In relation to the use of enzymatic treatments to produce ellagic acid, Huang et al. (2007c) reported that it is possible to reach better results with the use of combinations of ellagitannin acyl hydrolase, β -glucosidase and polyphenol oxidase or ellagitannin acyl hydrolase, cellulase, and xylanase from acorn fringe.

All reported works have focused on the evaluation of ellagic acid released considering aspects of process operation, recovery and optimization. However, physiological, biochemical, catalytic, and molecular aspects have not been considered seriously. In addition, a study to confirm the difference between tannin acyl hydrolase and ellagitannin acyl hydrolase is still necessary to demonstrate the catalytic differences of both enzymes and to understand the biodegradation processes of gallotannins and ellagitannins.

To say that ellagitannins and ellagic acid are compounds of importance is an understatement in light of their many implications in the pharmaceutical, cosmetic, environmental, food, nutraceutical, and beverage industries. However, it is necessary to develop new processes and to study new sources for their production. Moreover, it is necessary to identify and characterize key enzymes involved in the hydrolysis HHDP group of ellagitannins.

Acknowledgement This work is part of a research project financed by the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and the cooperation program ECOS-Nord-ANUIES-CONACYT (M02-A02).

References

- Aguilar CN, Gutiérrez-Sánchez G (2001) Review sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. *Food Sci Technol Int* 7:373–382
- Aguilar CN, Rodríguez R, Gutierrez-Sanchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragán LA, Ramírez-Coronel A, Contreras-Esquivel JC (2007a) Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:47–59
- Aguilar CN, Aguilera-Carbo A, Robledo-Olivo A, Ventura J, Belmares-Cerda R, Martínez D, Rodríguez-Herrera R, Contreras-Esquivel JC (2007b) Production of antioxidants and nutraceuticals by solid state cultures of pomegranate residues (*Punica granatum*) and creosote bush (*Larrea tridentata*). *Food Technol Biotechnol* (in press: FTB SI 185)
- Aguilera-Carbo A, Garcia-Agustince CA, Belmares RE, Aguilar CN (2005) Inhibitory Effect of ellagic acid from pomegranate husk (*Punica granatum*) and (*Larrea tridentata*) on different foodborne pathogens. *Proceeding of the International Congress on Food Safety* 2005. Monterrey, NL, Mexico
- Aguilera-Carbo A, Hernandez-Rivera JS, Prado-Barragan LA, Augur C, Favela-Torres E, Aguilar CN (2007) Ellagic acid production by solid state culture using a *Punica granatum* husk aqueous extract as culture broth. *Proceedings of the 5th International Congress of Food Technology, Thessaloniki, Greece*
- Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM (2001) Walnut Polyphenols inhibit In Vitro Human Plasma and LDL Oxidation. *J Nutr* 131:2837–2842
- Andrade P, Ferreres F, Gil MI, Tomás-Barberán FA (1997) Determination of Phenolic Compounds in Honeys with Different Floral Origin by Capillary Zone Electrophoresis. *Food Chem* 60:79–84
- Bala I, Bhardwaj V, Hariharam S, Ravi-Kumar MNV (2006) Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *J Pharmaceut Biomed Anal* 40:208–210
- Belmares-Cerda 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. *Lebensmitt Wiss Technol* 37:857–864
- Betnoit RE, Starkey RL, Basaraba J (1968) Effect of purified plant tannin on decomposition of some organic compounds and plant materials. *Soil Sci* 105:153–158
- Bhat TK, Singh B, Sharma OP (1998) Microbial degradation of tannins—a current perspectives. *Biodegradation* 9:343–357
- Bianco MA, Andaji A, Savolainen H (1998) Quantitative analysis acid in hardwood samples. *Sci Tot Environ* 222:123–126
- Chen LG, Yen KY, Yang LL, Hatano T, Okuda T, Yoshida T (1999) Macrocyclic ellagitannin dimers, cuphiins D₁ and D₂, and ac-

- companying tannins from *Cuphea hyssopifolia*. *Phytochemistry* 50:307–312
- Clifford MN, Scalbert A (2000) Review: Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 80:1118–1125
- Constantin R (1997) Boosting Ellagic Acid in Strawberries. *Agric Res* 9:16–18
- Cruz-Hernandez MA, Contreras-Esquivel JC, Lara F, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN (2005) Isolation and evaluation of tannin-degrading strains from the Mexican desert. *Z Naturfor C* 60:844–848
- Cruz-Hernández M, Augur C, Rodríguez R, Contreras-Esquivel J, Aguilar CN (2006) Evaluation of culture conditions for tannase production by *Aspergillus niger* GH1. *Food Technol Biotechnol* 44:541–544
- Da Porto C, Calligaris S, Celotti E, Nicoli MC (2000) Antiradical Properties of Commercial Cognacs Assessed by the DPPH* Test. *J Agric Food Chem* 48:4241–4245
- Deschamps A, Otuk G, Lebeault J (1983) Production of tannase and degradation chestnut tannin by bacteria. *J Ferment Technol* 61:55–59
- Doussot F, Pardon P, Dedier J, De Jeso B (2000) Individual, species and geographic origin influence on cooperage oak extractible content (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* Liebl.). *Analisis* 28:960–965
- Edelmann A, Lendi B (2002) Toward the Optical Tongue: Flow-Through Sensing of Tannin-Protein Interactions Based on FTIR Spectroscopy. *J Am Chem Soc* 124:14741–14747
- El-Toumy SAA, Marzouk MK, Rauwald HW (2001) Ellagi- and gallotannins from *Punica granatum* heartwood. *Pharmazie* 56:823–824
- El-Toumy SAA, Rauwald HW (2002) Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Phytochemistry* 61:971–974
- Feldman KS, Saharabudhe K, Smith RS, Scheuchzuber WJ (1999) Immunostimulation by Plant polyphenols: Relationship between tumor necrosis factor- α production and tannin structure. *Bioorg Med Chem Let* 9:985–990
- Ferreres F, Blazquea MA, Gil MI, Tomas-Barberan FA (1994) Separation of Honey Flavonoids by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography. *J Chromatogr A* 669:268–274
- Field JA, Lettinga G (1992a) Toxicity of tannic compounds to microorganisms. In: Hemingway RW, Lanks E (eds) *Plant Polyphenols: synthesis, properties, significance*. Plenum, New York, pp 673–692
- Field JA, Lettinga G (1992b) Biodegradation of tannins. In: Metal ions in biological systems volume 28. *Degradation of environmental pollutants by microorganisms and their metalloenzymes*. Marcel Dekker, New York, pp 61–67
- Fukuda T, Ito H, Yoshida T (2003) Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 63:795–801
- Garro GJM, Riedl B, Conner AH (1997) Analytical studies on tara tannins. *Holzforchung* 51:235–243
- Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48:4581–4589
- Goel G, Puniya AK, Aguilar CN, Singh K (2005) Interaction of gut microflora with tannins in feeds. *Naturwissenschaften* 92:497–503
- Goldstein JL, Swain T (1965) The inhibition of enzymes by tannins. *Phytochemistry* 4:185–192
- Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR (1998) HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J Sci Food Agric* 77:543–551
- Hartzfel WP, Forkner R, Hunter DM, Hagerman EA (2002) Determination of hydrolyzable tannin (Gallotannins and Ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *J Agric Food Chem* 50:1785–1790
- Haslam E, Cai Y (1994) Plants polyphenols (vegetable tannins): gallic acid metabolism. *Nat Prod Rep* 11:41–66
- Hayashi T, Maruyama H, Kasai R, Hattori K, Takasuga S, Hazeki O, Yamasaki K, Tanaka T (2002) Ellagitannins from *Lagerstroemia speciosa* as activators of glucose transport in fat cells. *Letters Plant Med* 68:173–175
- Hoffmann AS, Gross GG (1990) Biosíntesis of gallotannins: formation of polygalloylglucoses by enzymatic acylation of 1,2,3, 4,6-penta-*O*-galloylglucose. *Arch Biochem Biophys* 283:530–532
- 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, Gong GH, Lu YR (2007a) Individual and combined effects of physicochemical parameters on ellagitannin acyl hydrolase and ellagic acid production from ellagitannin by *Aspergillus oryzae*. *Bioproc Biosyst Eng* 30:281–288
- Huang W, Niu H, Li Z, Lin W, Gong G, Wang W (2007b) Effect of ellagitannins acyl hydrolase, xylanase and celulase on ellagic acid production from cups extract of valonia acorns. *Proc Biochem* 42:1291–1295
- Huang W, Niu H, Li Z, Lin W, Li L, Wang W (2007c) Ellagic acid from acorn fringe by enzymatic hydrolysis and combined effects of operational variables and enzymes on yield of the production. *Biores Technol*, doi:10.1016/j.biortech.2007.04.026
- Huang W, Li Z, Niu H, Li L, Lin W, Yang J (2007d) Utilization of acorn fringe for ellagic acid production by *Aspergillus oryzae* and *Endomyces fibuliger*. *Biores Technol*, doi:10.1016/j.biortech.2007.07.047
- Isaza JH, Ito H, Yoshida T (2004) Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*. *Phytochemistry* 65:359–367
- Ito H, Miyake M, Nisitani E, Mori K, Hatano T, Okuda T, Konoshima T, Takasaki M, Kozuda M, Mukainaka T, Tokuda H, Nishino H, Yosida T (1999) Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. *Cancer Lett* 143:5–13
- Kähkönen MP, Hopia AI, Heinonen M (2001) Berry Phenolics and Their Antioxidants Activity. *J Agric Food Chem* 49:4076–4082
- Khanbabaee K, van Ree T (2001) Tannins: classification and definition. *Nat Prod Rep* 18:641–649
- Kaponen JM, Happonen AM, Mattila PH, Törrönen A (2007) Contents of Anthocyanins and Ellagitannins in Selected Foods Consumed in Finland. *J Agric Food Chem* 55:1612–1619
- Knudson L (1913) Tannic acid fermentation. *J Biol Chem* 14:159–184
- Lee JH, Talcott ST (2002) Ellagic acid and ellagitannins affect on sedimentation in muscadine juice and wine. *J Agric Food Chem* 50:3971–3976
- Lee JH, Talcott ST (2005) Enzyme hydrolysis of ellagic acid derivatives in muscadine grapes (*Vitis rotundifolia*). Session 36E, Fruit & Vegetable Products: General. IFT Annual Meeting, July 15–20, New Orleans, Louisiana, USA
- Lee SH, Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I (2004) Structure and biogenesis of Jolkinin, a highly oxygenated Ellagitannin from *Euphorbia jolkinii*. *J Nat Prod* 67:1018–1022
- Lei Z, Jervis J, Helm RF (2001) Use of Methanolysis for the Determination of Total Ellagic and Gallic acid Contents of Wood and Food Products. *J Agric Food Chem* 49:1165–1168
- Lei Z (2002) *Monomeric Ellagitaninins in Oaks and Sweetgum*. Doctoral dissertation. Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment. April 25, Blacksburg, Virginia, USA
- Lekha PK, Lonsane BK (1997) Production and application of tannin acyl hydrolase: State of the art. *Adv Appl Microbiol* 44:215–260
- Li M, Kai Y, Qiang H, Dongying J (2006) Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J Basic Microbiol* 46:68–84

- Määttä KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR (2003) High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of phenolic compounds in berries with diode array and electrospray ionization Mass Spectrometric (MS) detection *ribes* species. *J Agric Food Chem* 51:6736–6744
- Määttä-Riihinen KR, Kamal-Eldin A, Törrönen AR (2004) Identification and Quantification of Phenolics Compounds of *Fragaria* and *Rubus* species (Family Rosaceae). *J Agric Food Chem* 52:6178–6187
- Machado TB, Leal ICR, Amaral CF, dos Santos KRN, da Silva MG, Kuster RM (2002) Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *J Braz Chem Soc* 13:606–610
- Mullen W, Stewart AJ, Lean MEJ, Gardner P, Duthie GG, Crozier A (2002) Effect of freezing and storage on the phenolics, ellagitannins, flavonoids, and antioxidant capacity of red raspberries. *J Agric Food Chem* 50:5197–5201
- Mullen W, Yokota T, Lean MEJ, Crozier A (2003) Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry* 64:617–624
- Niemetz R, Schilling G, Gross GG (2001) Ellagitannin biosynthesis: oxidation of pentagalloylglucose to tellimagrandin II by an enzyme from *Tellima grandiflora* leaves. *Chem Commun* 1:35–36
- Niemetz R, Gross GG (2003) Oxidation of pentagalloylglucose to the ellagitannin, tellimagrandin II, by a phenol oxidase from *Tellima grandiflora* leaves. *Phytochemistry* 62:301–306
- Niemetz R, Gross GG (2005) Enzymology of gallotannin and ellagitannin biosynthesis. *Phytochemistry* 66:2001–2011
- Notka F, Meiel GN, Wagner RN (2004) Concerted inhibitory activities of *Phyllanthus amarus* on HIV replication in vitro and ex vivo. *Antivir Res* 64:93–102
- Ohtani II, Gotoh N, Tanaka J, Higa T, Gyamfi MA, Aniya Y (2000) Thonningianins A and B, new antioxidants from the African medicinal herb *Thonningia sanguinea*. *J Nat Prod* 63:676–679
- Okuda T, Yoshida T, Hatano T, Ikeda Y, Shingu T, Inoue T (1986) Constituents of *Geranium thunbergii* SIEB. Et ZUCC. XIII. Isolation of water-soluble tannins by centrifugal partition chromatography, and biometric synthesis of elaeocarpusin. *Chem Pharm Bull* 34:4075–4082
- Okuda T, Yosida T, Hatano T (1993) Classification of oligameric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry* 32:507–521
- Olsson ME, Ekvall J, Gustavsson KE, Nilson J, Pillai D, Sjöholm I, Svensson U, Akesson B, Nyman MGL (2004) Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage. *J Agric Food Chem* 52:2490–2498
- Comisión de Patentes Europeas, Oficina Española de Patentes y Marcas, No. De publicación ES 2032899, No. de Solicitud Europea: 888109207.6. fecha 14–12–1988
- Przewloka SR, Shearer BJ (2002) The further chemistry of Ellagic Acid II. Ellagic Acid and water-soluble ellagates as metal precipitants. *Holzforchung* 56:13–19
- Quideau S, Feldman KS (1996) Ellagitannin chemistry. *Chem Rev* 96:475–503
- Quideau S, Feldman KS (1997) Ellagitannins chemistry. The first synthesis of dehydrohexahydroxydiphenolate esters from oxidative coupling of unethersified methyl gallate. *J Org Chem* 62:8809–8813
- Quinn MK, Singleton VL (1985) Isolation and identification of ellagitannins from whit oak wood and an estimation of their roles in wine. *Am J Enol Vitic* 36:148–155
- Ramirez-Coronel MA, Viniestra-González G, Darvill A, Augur C (2003) *Microbiology* 149:2941–2946
- Robledo-Olivo A, Martínez JL, Aguilera-Carbo A, Garza-García Y, Aguilar CN (2006) Pomegranate residues assessment for potential use as support in solid state fermentation for antioxidant production. Proceedings of the 2nd International Congress on Bioprocesses in Food Industries, ICBF2006. University of Patras, Rio Patras Greece
- Ruibal BJJ, Dubet EM, Martínez LF, Noa RE, Vargas GLM, Santana RJL (2003) Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea* Morelet. *Rev Cubana Farm* 37:1–8
- Saavedra PGA, Couri S, Ferreira LSG, de Brito ES (2005) Tanase: Conceitos, Produção e Aplicação. B.CEPPA, Curitiba. 23:435–462
- Sánchez-Alvarado EE (2001) Aplicación y usos potenciales de la tanasa y los taninos. Thesis. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, México
- Scalbert A, Duval L, Peng S, Monties B (1990) Polyphenols of *Quercus robur* L. II. Preparative Isolation by Low-Pressure and High-Pressure Liquid Chromatography of Heartwood Ellagitannin. *J Chromatogr* 502:107–119
- Scalbert A (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30:3875–3883
- Seeram N, Lee R, Hebert D (2005) Rapid scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separ Purif Technol* 44:49–55
- Shi B, Qiang H, Kai Y, Huang W, Quin L (2005) Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*. *J Chem Technol Biotechnol* 80:1154–1159
- Silva O, Duarte A, Pimentel M, Viegas S, Barroso H, Machado J, Pires I, Cabrita J, Gomes E (1997) Anticicrobial Activity of *Treminalia macroptera* root. *J Ethnopharmacol* 57:203–207
- Spencer CM, Cai Y, Martín R, Gaffney SH, Goulding PN, Magnolato D, Lilley TH, Haslam E (1988) Polyphenol complexation—some thoughts and observations. *Phytochemistry* 27:2397–2409
- Swain T, Bate-Smith EC (1962) In Comparative Biochemistry. Academic, vol. 3A. New York, USA, pp 755–809
- Tan GH, Pezuto JM, Kinghorn AD (1991) Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *J Nat Prod* 54:143–154
- Talcott SU, Talcott ST, Percival SS (2003) Low concentrations of Quercetin and Ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells. *J Nutr* 133:2669–2674
- Tatsuo K, Mitsuhiko N, Mokoto I, Yukio O, Yosisada Y, Nobuo O (1999) Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. *Plant Med* 64:27–30
- Uchiumi F, Hatano F, Ito H, Yoshida T, Tanuma SI (2003) Transcriptional suppression of the HIV promoter by natural compounds. *Antivir Res* 58:89–98
- Vaquero I, Marcobal A, Muñoz R (2004) Tannase activity by lactic bacteria isolated from grape must and wine. *Int J Food Microbiol* 96:199–2004
- Vattem DA, Shetty K (2002) Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporum*. *Food Biotechnol* 16:189–210
- Vattem DA, Shetty K (2003) Ellagic acid production and phenolic antioxidants activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpo*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Proc Biochem* 39:367–379
- Ventura J, Belmares-Cerda R, Aguilera-Carbo A, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN (2007) Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata* Cov.) and tar bush (*Flourenca cernua*) for gallic and ellagic acids production. *Food Technol Biotechnol* (in press: FTB SI 182)

- Vivot C, Scalbert A, Herve du Penhoat CLM, Moutounet M (1994) Ellagitannins in woods of sessil oak and sweet chestnut. Dimerization and hydrolysis during wood aging. *Phytochemistry* 36:1253–1260
- Vivas N, Laguerre M, Pianet de Boissel I, Vivas de Gaulejac N, Nonier MF (2004) Conformational Interpretation of Vascalagina and Castalagin Physicochemical Properties. *J Agric Food Chem* 52:2073–2078
- Wada L, Ou B (2002) Antioxidant activity and phenolic content of Oregon caneberries. *J Agric Food Chem* 50:3495–3500
- Wang CC, Chen LG, Yang LL (1999) Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea Hyssopifolia*. *Cancer Lett* 140:195–200
- Wilson E, Hagerman A (1990) Ellagitannins in plant are hydrolyzed to release ellagic acid, which forms a colored product upon reaction with nitrous acid. *J Agric Food Chem* 38:1678–1683
- Yoshida T, Amakura Y, Koyura N, Ito H, Isaza JH, Ramirez S, Peláez DP, Renner SS (1999) Oligomeric hydrolysable tannins from *Tibouchina multiflora*. *Phytochemistry* 52:1661–1666
- Zhang YJ, Abe T, Tanaka T, Yang CR, Kouna I (2001) Phyllanem-blinins A-F, New Ellagitannins from *Phyllanthus emblica*. *J Nat Prod* 64:1527–1532
- Zheng Z, Shetty K (2000) Solid-state bioconversion of phenolics from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* beta-glucosidase. *J Agric Food Chem* 48:895–900

Apéndice B

Ellagic Acid Production from Biodegradation of Creosote Bush Ellagitannins by *Aspergillus niger* in Solid State Culture

Antonio Aguilera-Carbo · Juan S. Hernández ·
Christopher Augur · Lilia A. Prado-Barragan ·
Ernesto Favela-Torres · Cristóbal N. Aguilar

Received: 5 September 2007 / Accepted: 29 January 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract The ability of *Aspergillus niger* GH1 in converting creosote bush ellagitannins into ellagic acid (EA) was evaluated in solid state culture. Creosote bush leaves were used to extract the ellagitannins fraction, which was impregnated in polyurethane foam used as support of solid state culture. Ellagitannins content, EA accumulation, and the related enzymatic activities were evaluated. *A. niger* GH1 was able to completely degrade creosote bush ellagitannins with an EA yield of 23.1% at 36 h of culture. The ability to degrade creosote bush ellagitannins exhibited by *A. niger* GH1 was clearly associated to an ellagitannin-hydrolysing enzyme with a maximum activity of 43 U/l, while that ability was not associated to tannase activity that was detected in the culture extract. This study demonstrated the great ability of *A. niger* GH1 to hydrolyze ellagitannins and the potential of solid state culture to produce the antioxidant EA by degradation of creosote bush ellagitannins.

Keywords *Aspergillus niger* GH1 · Solid state culture · Creosote bush ellagitannins degradation · Ellagic acid

A. Aguilera-Carbo · J. S. Hernández · C. N. Aguilar (✉)
Food Research Department, School of Chemistry,
Universidad Autónoma de Coahuila,
25280 Saltillo, Coahuila, Mexico
e-mail: cag13761@mail.uadec.mx

C. Augur
IRD- Unité Biotrans, IMEP Case 441,
Faculté des Sciences de Saint Jérôme, Université Paul Cézanne,
Av. Escadrille Normandie-Niemen,
13397 Marseille Cedex 20, France

L. A. Prado-Barragan · E. Favela-Torres
Department of Biotechnology,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Iztapalapa 09340 Federal District, Mexico

Introduction

Ellagic acid (EA) is a phenolic compound naturally occurring in several plants, such as oak tree, eucalyptus, pomegranate, strawberry, raspberry, blueberry, blackberry, cranberry, gooseberry, grape, pecan, walnut, valonea, and creosote bush (Seeram et al. 2004; Koponen et al. 2007). In recent years, EA has been reported as a potent antioxidant, anticarcinogenic, antiviral, antimutagenic, and antiparasitic molecule and have shown attractive alternatives of applications (Martens-Talcott et al. 2003; Ruibal et al. 2003; Vattem and Shetty 2003; Fukuda et al. 2003; Olsson et al. 2004; Okuda 2005; Huetz et al. 2005; Divipriya et al. 2007).

EA is usually present in plant sources as ellagitannins, which consist of glucose esterified with hexahydroxydiphenic acid, gallic acid, and their derivatives (Fig. 1). To obtain EA from plants, some studies on hydrolyzing ellagitannins with acid or base have been reported (Daniel et al. 1991; Shi et al. 2005). Due to variation in plant sources, the differences of ellagitannins structure, and the difficulty of purification, these chemical methods often lead to low yields of EA and considerable impurities.

In this study, the biodegradation of creosote bush ellagitannins was studied. Creosote bush ellagitannins contain a large proportion of hexahydroxydiphenoyl groups, having the potential to yield a high amount of EA. However, about the enzyme(s) involved in the process of ellagitannins biodegradation, the information is scarce and confuse. Shi et al. (2005) hypothesized the role of typical tannase (tannin acyl hydrolase, TAH) and polyphenol oxidase in this biochemical event. Some reports of tannin biodegradation have been published (Bath et al. 1998; Aguilar et al. 2007), and the role of a nontypical tannase (ellagitannase) has been seriously

considered and partially demonstrated in the studies carried out by Huang et al. (2007a, b, c, d).

In this study, the ability of *A. niger* GH1 to convert creosote bush ellagitannins into EA was evaluated. The degradation of ellagitannins and the related enzymes produced in solid state culture (SSC) were estimated and associated with EA accumulation.

Materials and Methods

In this study, the creosote bush ellagitannins biodegradation was evaluated in SSC. For that culture, total creosote bush polyphenols (TCbP) were used as sole carbon source and inducer of related enzymes involved in biodegradation of ellagitannins.

Microorganism and Plant Material

A. niger strain GH1 (culture collection of the DIA-UADEC, Saltillo, Coahuila, Mexico) was used in this study because of its potential to degrade polyphenols. Fungal strain was previously isolated, identified, and characterized (Cruz-Hernández et al. 2005).

Creosote bush shrubs were collected from the desert region of Coahuila State in North Mexico and transported to the Microbiology Laboratory of the Food Research Department, where the material was cleaned, dried at 60 °C during 48 h, pulverized in a homogenizer LP12 series 600 (Maquinaria®, Monterrey, Nuevo León, Mexico), and stored at room temperature in black bags.

Polyphenols Extraction and Ellagitannins Fractionation

Creosote bush powder was refluxed with acetone at 70% in the ratio of 1:4 (*w/v*) by 12 h at 60 °C. Then, it was filtered through Whatman no. 41 filter. Solvent was eliminated in a rotovapor system (model RE 540, Yamato Scientific America, Inc., Santa Clara, CA, USA.). The aqueous extract was lyophilized in a vacuum system (Labconco, FreeZone Dry system, Kansas City, MO, USA) until obtaining a green powder considered as TCbP. Based on the ellagitannins fractionation protocol reported by Seeram et al. (2005), it was possible by it to obtain the substrate used in the enzymatic assay for ellagitannin-hydrolysing activity. Briefly, the extraction of ellagitannins consisted in a depigmentation of TCbP using hexane, sugars content was removed with ethanol, and finally, a column packed with amberlite lipophilic resin preequilibrated with water and methanol and eluted with increasing amounts of methanol was used to obtain the ellagitannins. Content of ellagitannins was quantified by the method reported by Ascacio et al. (2007), employing the high-performance

liquid chromatography (HPLC) method and using as standard punicalagin extracted from pomegranate peels supplied by the Bioprocess Laboratory of the Food Research Department (School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila).

Culture Medium

The culture medium used for EA production was previously reported by Robledo et al. (2008), and it contained (g/l) NaNO₃ (6.0), KH₂PO₄ (1.520), KCl (0.52), MgSO₄·7H₂O (0.52), ZnSO₄ (0.0010), FeCl₃ (0.00085), 0.05% of yeast extract, and 1.0 ml trace metals solution. Trace metal solution was composed of (mg/l) Na₂B₄O₇·10H₂O (100.0), MnCl₂·4H₂O (50.0), Na₂MoO₄·2H₂O (50.0), and CuSO₄·5H₂O (250.0). The pH of the medium was adjusted to 5.0, and then, the medium was autoclaved (1.1 kg/cm³; 121 °C) for 15 min. When the medium temperature was 35 °C, TCbP were added at a final concentration of 12 g/l. The pH was 5.5. The medium was filtered–sterilized through nylon membranes of 25-mm diameter and 0.45-μm pore size.

Solid State Culture

The EA production was evaluated in SSC employing polyurethane foam (PUF; 3 g) as support into 250 ml reactors. Support was impregnated with the culture medium at an initial moisture content of 70%. Inoculum was previously added to the culture medium at a level of 2 × 10⁷ spores per gram of support. Wet PUF was carefully homogenized, incubated at 30 °C, and monitored during 96 h. All samples were analyzed in triplicates.

Crude Extract Recovery

A total of 20 ml of citrate buffer (pH 5.0, 25 mM) was added to each reactor, homogenized during 1 min and separated by filtration using Whatman no. 40 filter; later, the filtered extract was refiltered by 0.45-μm nylon membranes, and the new extract was used to analyze the ellagitannins and glycosides consumption, EA accumulation, TAH, and ellagitannin-hydrolyzing activity (EHA).

Analytical Determinations

Glycosides consumption was carried out by phenol-sulfuric method (Dubois et al. 1956). The TCbP concentration was determined by the modified Folin–Ciocalteu method (Makkar et al. 1993). Ellagitannins content was quantified by the HPLC method reported by Ascacio et al. (2007). For EA recovering and quantification, the method employed was as follows: An aliquot of extract was added into 1.5-ml

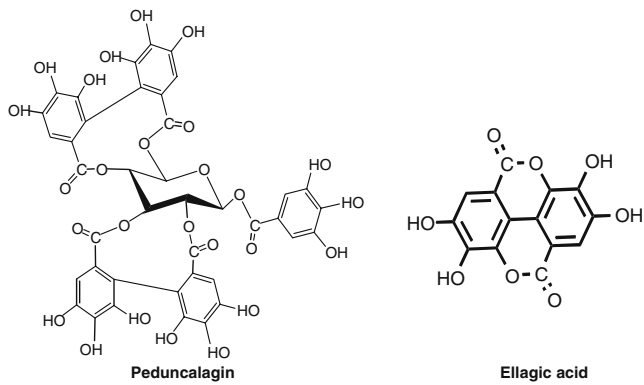


Fig. 1 Chemical structures of a typical ellagitannin and ellagic acid

conic tubes and centrifuged at 6,000 rpm (3,600 g) during 20 min. The supernatant was decanted, and the precipitate was resuspended in ethanol. The sample was mixed into a sonic bath for 20 min. The sample with suspended material was filtered through 0.45- μm nylon membrane and injected into HPLC. The EA recovered was quantified by HPLC (Varian Pro Star, Palo Alto, CA, USA) using a photodiode array detector (PDA Pro Star 330) at 254 nm. Separation was carried out with a Prodigy ODS column (5 μm ; 250 \times 4.6 mm, Phenomenex) and temperature of 30 $^{\circ}\text{C}$. A gradient profile of mobile phase, consisting of acetonitrile (solvent A) and 0.3% acetic acid in water (v/v; solvent B), 7–20% A (0–7 min), 20–30% A (7–12 min), 30% A (12–18 min), 30–60% A (18–20 min), 60–100% A (20–23 min), 100% A (23–30 min), 7% A (30–31 min), and 7 min for baseline stabilization was applied at a flow rate of 0.7 ml/min. The sample injection was of 10 μl . TAH activity was assayed using the HPLC method reported by Aguilar et al. (1999). A TAH unit was defined as the amount of enzyme required to release one micromole of gallic acid under assay conditions. EHA was assayed using the HPLC method reported by Aguilera-Carbo et al. (2007a). An EHA unit was defined as the amount of enzyme required to release one micromole of EA under assay conditions.

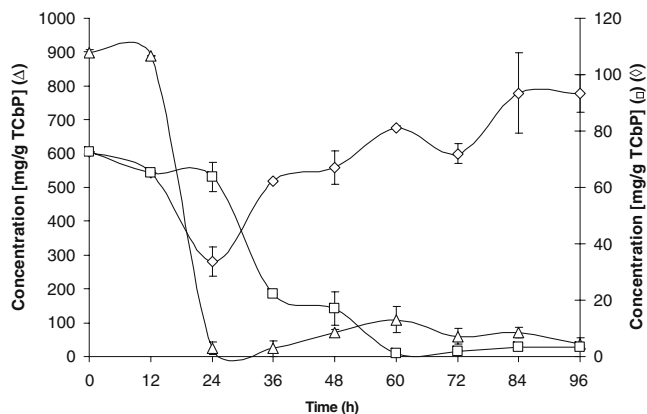


Fig. 2 Kinetics of consumption of glycosides (triangle), total creosote bush polyphenols (hatched line), and ellagitannins (square) by *A. niger* GH1 in SSC

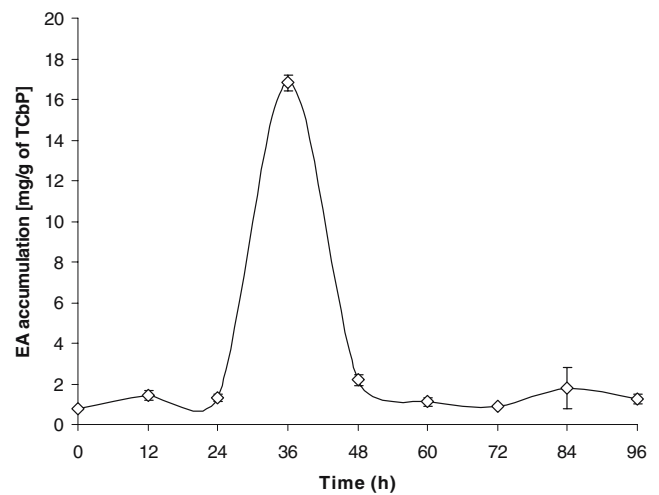


Fig. 3 Ellagic acid accumulation during the fungal SSC of total creosote bush polyphenols on PUF

Results and Discussion

Figure 2 shows the glycosides consumption by *Aspergillus niger* GH1. The depletion of total glycosides was fast during the first 24 h of culture, and it permitted a rapid mycelial invasion on trabecules of PUF. Phenolics content was also reduced during the first 24 h of culture as result of consumption of free monomers present in the TCbP fraction (Robledo et al. 2008), and then, an increment of these compounds was detected as a result of enzymatic hydrolysis of TCbP (Fig. 2).

Ellagitannins content remained unchanged during the first 24 h of culture because the fungus grew by consuming glycosides and free phenolics. However, after this period, glycosides were completely consumed by the fungus during the next 48 h of culture (Fig. 2).

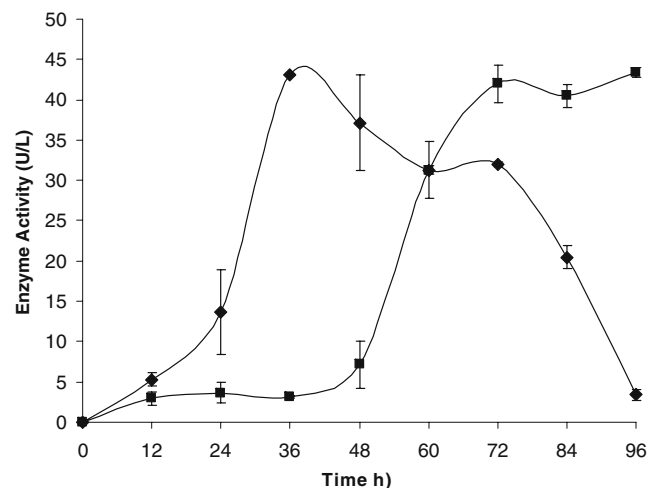


Fig. 4 Enzymatic activities related to creosote bush ellagitannin biodegradation in SSC by *A. niger* GH1. EHA (diamond) and TAH (square)

Maximum concentration of EA released was reached at 36 h of culture with a yield of 23.1% of the total content of ellagitannins (Fig. 3). However, the EA was decreased, possibly because EA represents one of the substrates generated by the action of ellagitannin-hydrolyzing enzymes produced in SSC (Aguilera-Carbo et al. 2008). For this reason, it is very important to stop the fermentation at this time. Pattern of EA released was clearly associated to evaluated EHA, which was detected at its maximum level at the same time (36 min) and decreased afterward (Fig. 4).

Typical tannase activity was not associated to EA released because it was detected after 48 h of culture, maybe as the result of the presence of galloyl residues that are inducers of this enzyme (Aguilar et al. 2007).

The obtained results suggest that creosote bush ellagitannins are hydrolyzed by the ellagitanins-hydrolyzing enzymes, which has not been previously reported. In addition, these results demonstrated that typical tannase activity is not sufficient to hydrolyze ellagitannins as suggested by Shi et al. (2005) during their study of EA accumulation by the submerged co-culture of *A. niger* and *Candida utilis*. However, the EA yields obtained in both studies were very similar, 21% (Shi et al. 2005) and 23% (in our present study).

Important advances in EA production from ellagitannins have been reported in submerged co-cultures by Huang et al. (2007a, b, c). Recently, high EA yields (24%) were obtained after optimization of the co-culture of *A. oryzae* with *Trichoderma reesei* using acorn cups extract containing up to 62% ellagitannins as substrate (Huang et al. 2007c). However, in SSC, the information is limited to those studies reported by Vattem and Shetty (2002, 2003), using cranberry pomace as support and source of ellagitanins with very low EA yields. Huang et al. (2007c) suggested, for the first time, the presence of ellagitannin acyl hydrolase as the enzyme responsible of the EA accumulation, which indicates that a new tannase is involved in the biodegradation ellagitannins. Also, they reported that such enzyme had an synergistic activity with other enzymes as xylanase and cellulase to enhance the EA accumulation. However, further studies are needed to define the catalytic role and properties of this new EHA or ellagitannin acyl hydrolase detected.

It is known that tannins have a range of effects on various organisms, from toxic effects on animals to growth inhibition of microorganisms. Some microbes are, however, resistant to tannins, and have developed various mechanisms and pathways for tannin degradation in their natural habitats. Tannases generally act on gallotannins. However, in the particular case of ellagitannins, the information is scarce and confuse (Vivas et al. 2004), mainly due to their chemical complexity and diversity. Saavedra et al. (2005) reported that the production of EA has not been explored due to its high production cost and the great amount of

subproducts generated as result of ellagitannin biodegradation. This results in serious problems regarding the recovery and purification of EA. To date, there is no published data on ellagitannin degradation using biological methods (microbial or enzymatic). However, it is known that the selective hydrolysis of galloyl groups of the ellagitannin phyllianmbinin is catalyzed by tannase (Zhang et al. 2001). Vattem and Shetty (2002, 2003) reported on EA production from cranberry pomace fermented by a SSC using *Lentinus edodes*, attributing the catalysis to the enzyme β -glucosidase. Huang et al. (2005) described a new valonea tannin hydrolase as responsible for the biodegradation of valonea tannins. This enzyme is itself a TAH.

Recently, we have described relevant information about the advances and perspectives on microbial tannases (Aguilar et al. 2007), and also, we reported a review describing the advances on the microbial production of EA and the biodegradation of ellagitannins (Aguilera-Carbo et al. 2008).

Conclusions

The present research indicated that the SSC of *A. niger* GH1 using creosote bush ellagitannins impregnated in PUF could remarkably enhance EA accumulation, which was clearly associated to EHA. The EA yield of 23%, obtained under non-optimal conditions, suggests a new scheme for EA production from creosote bush, a yet poorly explored forest material.

Acknowledgment Financial support of this research was from the National Council of Science and Technology of Mexico with grant no. SEP-CONACYT-J-51360. Authors A. Aguilera-Carbo and J. S. Hernández-Rivera are graduate students supported by CONACYT, Mexico.

References

- Aguilar, C. N., Augur, C., Viniegra-González, G., & Favela, E. (1999). A comparison of methods to determine tannin acyl hydrolase activity. *Brazilian Archives in Biology and Technology*, 42, 355–361.
- Aguilar, C. N., Rodríguez, R., Gutierrez-Sanchez, G., Augur, C., Favela-Torres, E., Prado Barragán, L. A., et al. (2007). Microbial tannases: Advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(1), 47–59.
- Aguilera-Carbo, A. F., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2008). Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Applied Microbiology and Biotechnology* (in press). DOI 10.1007/s00253-007-1276-2.
- Aguilera-Carbo, A. F., Robledo-Olivo, A., Augur, C., Prado-Barragán, L. A., Favela-Torres, E., & Aguilar, C. N. (2007). Method for ellagic acid quantification in novel sources of this natural antioxidant. Proceedings of the 5th International Congress on Food Technology, Thessaloniki, Greece.

- Ascacio, J., Prieto-Nieto, A., Hernández-Rivera, J. S., Aguilera-Carbo, A., & Aguilar, C. N. (2007). Determination of ellagitannins in native plants of Mexican semiarid zone, relationship between two analytical methods. Proceedings of the Third Mexican Congress on Biopolymers: Advances and perspectives (p. 25).
- Bath, T. K., Singh, B., & Sharma, O. P. (1998). Microbial degradation of tannins—A current perspective. *Biodegradation*, *9*, 345–357.
- Cerdá, B., Cerón, J. J., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2003). Repeated oral administration of doses of the pomegranate ellagitannins punicalagin to rats for 37 days is not toxic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3493–3501.
- Cruz-Hernández, M., Contreras-Esquivel, J. C., Lara, F., Rodríguez, R., & Aguilar, C. N. (2005). Isolation and evaluation of tannin-degrading fungal stars from the Mexican desert. *Zeitschrift für Naturforschung*, *60*, 844–848.
- Daniel, M. E., Ratnayake, S., Kinstle, T., & Stoner, G. D. (1991). The effects of pH and intestinal contents on the liberation of ellagic acid from purified and crude ellagitannins. *Journal of Natural Products*, *54*, 946–952.
- Dvipriya, N., Srinivasan, M., Sudheer, A. R., & Menon, V. P. (2007). Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant imbalance: A drug dose dependent study. *Singapore Medical Journal*, *48*(4), 311–318.
- Dubois, M., Guiles, K. A., Hamiton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Analytical Chemistry*, *21*, 145–149.
- Fukuda, T., Ito, H., & Yoshida, T. (2003). Antioxidative polyphenols from walnuts (*Junglans regia* L.). *Phytochemistry*, *63*, 795–801.
- Huang, W., Ni, J., & Borthwick, A. G. L. (2005). Biosynthesis of valonia tannin hydrolase and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *A.niger* SHL 6. *Process Biochemistry*, *40*, 1245–1249.
- Huang, W., Niu, H., Gong, G., Lu, Y., Li, Z., & Li, H. (2007a). Individual and combined effects on physicochemical parameters on ellagitannin acyl hydrolase and ellagic acid production from ellagitannin by *Aspergillus oryzae*. *Bioprocess Biosystems Engineering*, *30*, 281–288.
- Huang, W., Niu, H., Li, Z., He, Y., Gong, W., & Gong, G. (2007c). Optimization of ellagic acid production from ellagitannins by co-culture and correlations between its yield and activities of relevant enzymes. *Bioresource Technology*, *99*, 769–775.
- Huang, W., Niu, H., Li, Z. m., Lin, W., Gong, G., & Wang, W. (2007b). Effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase and cellulase on ellagic acid production from cups extract of Valonia acorns. *Process Biochemistry*, *42*, 1291–1295.
- Huang, W., Niu, H., Li, Z., & Wang, W. (2007d). Ellagic acid from acorn fringe by enzymatic hydrolysis and combined effects of operational variable and enzymes on yield of the production. *Bioresource Technology*, *99*, 1518–1525.
- Huetz, P., Mavaddat, N., & Mavri, J. (2005). Reaction between ellagic acid and ultimate carcinogen. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *45*, 1564–1570.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Törrönen, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1612–1619.
- Makkar, H. P. S., Blümmel, M., Borowy, N. K., & Becker, K. (1993). Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of Science and Food Agriculture*, *61*, 161–165.
- Martens-Talcott, S. U., Talcott, S. T., & Percival, S. S. (2003). Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells¹⁻³. *Journal of Nutrition*, *133*, 2669–2674.
- Okuda, T. (2005). Systematics and Health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants. *Phytochemistry*, *66*, 2012–2031.
- Olsson, M. E., Ekvall, J., Gustavsson, T.-E., Nilsson, J., Pillai, D., Sjöholm, I., et al. (2004). Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x annanassa*): Effects of cultivar, ripening, and storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 2490–2498.
- Robledo, A., Aguilera-Carbo, A., Rodríguez, R., Martínez, J. L., Garza, Y., & Aguilar, C. N. (2008). Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (in press). DOI 10.1007/s10295-008-0309-x.
- Ruibal, B. I. J., Dubed, E. M., Martínez, L. F., Noa, R. E., Vargas, G. L. M., & Santana, R. J. L. (2003). Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de *Pinus caribaea* Morelet. *Revista Cubana de Farmacia*, *37*(2), 1–8.
- Saavedra, P. G. A., Couri, S., Ferreira, L. S. G., & de Brito, E. S. (2005). Tanase: Conceitos, produção e aplicação. *B. CEPPA. Curitiba*, *23*, 435–462.
- Seeram, N. P., Lee, R., Hardy, M., & Herber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, *41*, 49–55.
- Seeram, N. P., Lee, R., & Herber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinical Chimica Acta*, *348*, 63–68.
- 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.
- Vattem, D. A., & Shetty, K. (2002). Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnology*, *16*(3), 189–210.
- Vattem, D. A., & Shetty, K. (2003). Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace (*Vaccinium macrocarpon*) mediated by *Lentinus edodes* using a solid-state system. *Process Biochemistry*, *39*, 367–379.
- Vivas, N., Laguerre, M., Pianet de Boissel, I., Vivas de Gaulejac, N., & Nonier, M. F. (2004). Conformational interpretation of vascalagin and castalagin physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 2073–2078.
- Wang, C. C., Chen, L. G., & Yang, L. L. (1999). Antitumor activity of four macrocyclic ellagitannins from *Cuphea Hyssopifolia*. *Cancer Letters*, *140*, 195–200.
- Zhang, Y. J., Abe, T., Tanaka, T., Yang, C. R., & Kouna, I. (2001). Phyllanemblinins A-F, nre ellagitannins from *Phyllanthus emplica*. *Journal of Natural Products*, *64*, 1527–1532.

Apéndice C

ORIGINAL PAPER

Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources

^aAntonio F. Aguilera-Carbo, ^bChristopher Augur, ^aLilia A. Prado-Barragan,
^cCristóbal N. Aguilar*, ^aErnesto Favela-Torres

^aDepartment of Biotechnology, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, 09340, DF, México

^bIRD-Unité Biotrans, IMEP Case 441, Faculté des Sciences de Saint Jérôme, Université Paul Cézanne, Av. Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille cedex 20, France

^cFood Research Department, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, 25280 Saltillo, Coahuila, México

Received 6 November 2007; Revised 4 February 2008; Accepted 5 February 2008

Ellagic acid (EA) was quantified by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled with photodiode array detection (DAD) in five fine-powdered plants collected from the semiarid region of Mexico. Samples analysed included *Jatropha dioica* branches (Dragon's blood), *Euphorbia antisyphylitica* branches (Candelilla), *Turnera diffusa* Willd leaves (Damiana), *Flourensia cernua* leaves (hojasén) and *Punica granatum* husk (pomegranate) at two maturity stages ("turning" or intermediate and matured fruit, considered as positive controls). The results demonstrated high EA concentrations in all tested samples which are novel sources of this natural antioxidant. The method developed for the EA analysis is fast and it showed an excellent linearity range, repeatability, intra- and inter-day precision and accuracy with respect to the methods reported for the EA analysis.

© 2008 Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences

Keywords: ellagic acid, semiarid plants, HPLC analysis

Introduction

Natural compounds derived from plants are part of our daily diet. In recent years, there has been an increasing attention in healthy way of life along with the search for new natural products. Among them are specific antioxidants, such as ellagitannins and ellagic acid, now in high demand (Clifford & Scalbert, 2000; Manach et al., 2004). Ellagitannins (ET's), one of the major groups of hydrolysable tannins, are esters of hexahydroxydiphenic acid (HHDP) and polyols, usually glucose or quinic acid. When exposed to acids or strong bases, ester bonds are hydrolysed and the hexahydroxydiphenic acid spontaneously rearranges into the water-insoluble dilactone, ellagic acid (EA) (2,3,7,8-tetrahydroxychromeno[5,4,3-cde]chromene-5,10-dione, according to IUPAC). EA is a highly thermodynamically stable molecule with

four rings representing the lipophilic domain, four phenolic (hydroxyl) and two lactone groups (which can act as hydrogen bond donor or acceptor) representing the hydrophilic part (Barch et al., 1996; Bala et al., 2006). Presently, the main sources of EA and ellagitannins are oak trees (*Quercus robur*, *Q. alba*), walnut (*Junglans nigra*) and chestnut (*Castanea sativa*) trees (Bianco et al., 1998). Berry fruits are the other sources of ellagitannins and ellagic acid (Table 1), including strawberry (*Fragaria ananassa*), raspberry (*Rubus idaeus*), blackberry (*Rubus occidentalis*), as well as some seeds and nuts (*Bertholletia excelsa* Humb), pecan (*Carya illinoensis*) (Clifford & Scalbert, 2000), and fruit, e.g. pomegranate (*Punica granatum* L.) (Atta-Ur-Rahman et al., 2001; Machado et al., 2002; Seeram et al., 2005; Koponen et al., 2007). EA has been associated with health improvement through its anti-atherosclerotic action (Aviram et al.,

*Corresponding author, e-mail: cag13761@mail.uadec.mx

Table 1. Main sources of naturally occurring ellagic acid

Plant source	Ellagic acid content/(mg g ⁻¹)
<i>Quercus robus</i> and <i>alba</i>	19.0–63.0 ^a
<i>Junglans nigra</i>	28.0 ^a
<i>Castanea sativa</i>	89.0 ^a
<i>Fragaria ananassa</i>	0.4–0.6 ^b
<i>Rubus idaeus</i>	1.2–1.5 ^b
<i>Rubus occidentalis</i>	1.5–2.0 ^b
<i>Bertholletia excelsa</i> Humb	0.59 ^b
<i>Carya illinoensis</i>	0.33 ^b
<i>Punica granatum</i>	0.78 ^c

a) Stoner and Gupta, 2001; b) Akiyama et al., 2001; c) El-Toumy and Rauwald, 2003.

2000). In addition, EA has been shown to have potent anti-carcinogenic properties resulting in a reduction of human colon, prostate, cervical, tongue, breast, oesophagus and skin cancer (melanoma) (Sharma et al., 1997; Stoner & Gupta, 2001; Varadkar et al., 2001; Asamy et al., 2003; Singh et al., 2003; Carraway et al., 2004; Huetz et al., 2005). EA treatments also resulted in cell-cycle arrest and apoptosis (natural cell death) along with the inhibition of tumour formation (Seeram et al., 2005). In some cases, EA reduced cancer by ellagitannins and ellagic acid even after symptom development. Moreover, studies have suggested that ellagic acid prevented the development of cells infected by the human papilloma virus (HPV) (Stoner & Gupta, 2001). In addition, furosin, a structurally characterised ellagitannin, was also shown to be effective in osteoclast differentiation and prevention of bone diseases (Park et al., 2004).

In addition to the observed effects on human health, EAs also exert antibacterial (Atta-Ur-Rahman et al., 2001; Machado et al., 2002; Akiyama et al., 2001) and antiparasitic activities (Elkhateeb et al., 2005). Increasing requirements on ETs in food supplement and pharmaceutical industries result in their higher demand and the need for simple isolation and characterisation methods of such molecules. In the processes of tannin, ellagitannins and EA extraction, different solvents such as water, methanol, ethanol, acetone, hexane, ethyl acetate, butanol, etc., are used in different percentage (Atta-Ur-Rahman et al., 2001; Koponen et al., 2007; Lei, 2002). Many techniques of EA purification, with different purification steps, have been developed. Specific separation columns such as the Dianion LP-20 or Sephadex LH-20 (Seeram et al., 2005; Machado et al., 2002; Asamy et al., 2003), Sep-Pak tC18 and the cartridges Bond Elut PSA (Amakura et al., 2000) allowing the separation of compounds, are commonly utilised. Nevertheless, expensive materials and equipment are required. HPLC systems are commonly used for detection and quantification. Several methods based on the reverse phase C18 column technology, with solvents

like methanol, ethanol, acetonitrile, mixed with acidified water (acetic or phosphoric acid) are reported. The major difficulty remains in the retention time as the use of solvents with high polarity results in long retention times. In addition, when solvent gradients are used, retention times increase from 30 min to 60 min. Another point is the validation using statistical analysis of acceptance criteria for biotech products (Wang et al., 2007). In the present work, a fast method for ellagic acid extraction, in combination with a HPLC scheme which reduces the time of analysis altogether, is presented. Additionally, the presence of EA was determined in five different plants presenting an alternative natural source of ellagitannins and ellagic acid.

Experimental

The analysis method was validated according to the guidelines of the international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) and recommendations of Wang et al. (2007).

Ellagic acid (high purity) was purchased from ICN Biomedicals Inc, USA. Solvents and mobile phases used were of HPLC grade and were obtained from Sigma-Aldrich, USA.

For the calibration curve (reference), a standard solution of different concentrations (0 µg mL⁻¹, 5 µg mL⁻¹, 10 µg mL⁻¹, 20 µg mL⁻¹, 30 µg mL⁻¹, 40 µg mL⁻¹, and 50 µg mL⁻¹) was prepared by dissolving EA in methanol. In the validation method, Czapek-Dox modified medium was used as described below (Treviño-Cueto et al., 2007) and dilutions of this solution were made for the linear calibration curve. The calibration curve was generated using six concentrations (in tetraplicates) of the EA standard solution, inter-day (different days) and intra-day (same day). The accuracy of the method was determined by recovery of known amounts of the EA standard in hexaplicates (Bala et al., 2006).

The samples for EA determination were prepared as follows: 1350 µg of EA were added to 7 mL of Czapek-Dox minimal medium and 20 mL of citrate buffer (pH 5.0, concentration 50 mM), EA concentration 50 µg mL⁻¹, mixed in an immersion blender (RI-VAL immersion blender, model IB901 MX) and then immersed in an ultrasonic bath at 40 kHz (Branson, Model 2510R-MTH, Branson Corp., CT, USA) in a 50 mL conical tube for 30 min. Later, aliquots were taken to prepare final EA concentration of 0 µg mL⁻¹, 10 µg mL⁻¹, 20 µg mL⁻¹, 30 µg mL⁻¹, 40 µg mL⁻¹, and 50 µg mL⁻¹, and filled to 1.5 mL with the Czapek-Dox minimal medium.

Ellagic acid extraction: An aliquot was placed in a 2 mL conical tube and centrifuged at 36000 min⁻¹ for 20 min. The supernatant was decanted and the precipitate was re-suspended in 1.5 mL of ethanol. The sample was ultrasonicated again for 30 min, filtered

through a 0.45 μm nylon membrane and injected into the HPLC system.

Plant samples for EA determination were prepared as follows: *Jatropha dioica* branches (Sangre de drago, Dragon's blood), *Euphorbia antisyphylitica* branches (Candelilla), *Turnera diffusa* Willd leaves (Damiana), *Flourensia cernua* leaves (hojasén) and *Punica granatum* husk (pomegranate) turning and red stages were used as the plant sources of EA. All plant materials were collected from semi-desert areas near Saltillo, Coahuila, Mexico, except the *Punica* fruits which were collected from Sabinas, Coahuila, Mexico. Sixty milligrams of each powdered and dried plant sample were transferred to tubes with screw caps containing 4.95 mL of methanol and 50 μL of 6 M HCl (Lei, 2002). The tubes were closed and the content was incubated for 168 h at 90 °C. After cooling, this material was filtered through a Whatman No. 41 in a vacuum system. An aliquot of 1.5 mL of the filtered fraction was centrifuged at 36000 min^{-1} for 20 min. The supernatant was decanted and the precipitate was re-suspended in ethanol (1.5 mL). The sample was ultrasonicated for 30 min, the material was filtered through a 0.45 μm nylon membrane and injected into the HPLC system.

Chromatography: HPLC analysis was carried out using a Varian Pro-Star 330 system using a modification of the Amakura et al. (2000) method. A Varian Pro-Star 330 photodiode array (PDA) detector with detection at 254 nm was used. Fractionation of the injected material was carried out on an Optisil ODS column (5 μm , 250 \times 4.6 mm) at 25 °C. An isocratic mobile phase consisting of acetonitrile (solvent A) and water : phosphoric acid (pH 2.5, solvent B), in the ratio of 30 : 70 was applied at the flow rate of 0.7 mL min^{-1} . Sample injection volume was 10 μL , retention time was 5.1 min.

Method validation: Linearity was evaluated using linear regression analysis (Bala et al., 2006). Precision was determined by repeatability (intra-day). Repeatability was assessed analysing six sample solutions of 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ under the same operating conditions. Accuracy was determined by the recovery of known amounts of the EA standard solution on the Czapek-Dox medium in hexaplicate.

Results and discussion

The calibration curve for EA was constructed in the concentration range of 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ showing excellent linearity with a correlation coefficient of 0.9947 indicating a compliance with the Beer-Lamberts law. The relative standard deviation (RSD) was used to validate the determination repeatability (Table 2). Precision and accuracy were estimated intra- and inter-day for the same calibration curve. The accuracy was found to be in the range of 99.3–100.4 % and 98.6–100.3 %, respectively, in agreement with the true and observed values (Table 3). In or-

Table 2. HPLC method validation parameters of EA calibration curve (reference)

Parameters	HPLC
Linearity range/ $(\mu\text{g mL}^{-1})$	5–50
Linearity	$0.9947 \pm 0.0025(0.25)^a$
Repeatability/%	100.2 ± 1.15^b

a) Values are the mean \pm SD (RSD) of $n = 4$ calibration curves; b) six replicates were analysed for each sample evaluated on six consecutive days.

Table 3. Estimated intra- and inter-day precision and accuracy of EA standard curve

Concentration $\mu\text{g mL}^{-1}$	Intra-day		Inter-day ^a	
	Accuracy %	RSD ^b %	Accuracy %	RSD ^b %
10	99.3	0.55	98.6	0.54
30	100.4	1.66	100.3	2.50
50	99.8	1.90	99.5	1.34

a) Four replicates were analysed for each sample evaluated on four consecutive days; b) mean RSD value of $n = 4$ calibration curves.

Table 4. Estimated inter-day accuracy and precision of samples with EA in Czapek-Dox medium

Concentration $\mu\text{g mL}^{-1}$	Inter-day ^a	
	Accuracy %	RSD ^b %
10	105.05	0.52
20	108.08	8.84
30	109.19	1.47
40	102.11	0.645

a) two replicates were analysed for each sample evaluated on four consecutive days; b) mean RSD value of $n = 6$ sample treatments.

der to recreate a complex medium, EA solutions of increasing concentrations were added to the Czapek-Dox medium and samples were prepared for HPLC analysis. Accuracy was in the range between 102–109 % (Table 4), and the correlation coefficient obtained as the mean value of slope values average was 0.9914 ± 0.00338 , showing a good linearity. Ellagic acid was extracted and quantified from novel plant sources. The data are presented in Table 5.

The data in Table 1 demonstrate that all samples are either excellent or good sources of EA. The EA content has been previously reported in samples of *Punica granatum* husk and the results obtained in this study are in agreement with the literature (Seeram et

Table 5. Quantification of ellagic acid present in different plant sources

Plant	Ellagic acid/(mg g ⁻¹) ^{a,b}
<i>Punica granatum</i> turning	33.79 ± 7.43
<i>Punica granatum</i> red	12.80 ± 5.83
<i>Euphorbia antisiphylitica</i>	2.18 ± 0.39
<i>Flourensia cernua</i>	1.59 ± 0.96
<i>Tumera diffusa</i> Willd	0.87 ± 0.59
<i>Jatropha dioica</i>	0.81 ± 0.43

a) Values are the mean of $n = 3$ experiments; b) dry base.

al., 2005; Machado et al., 2002; El-Toumy & Rauwald, 2002, 2003). However, for all other samples tested, this is the first study reporting their EA content and demonstrating the high potential of these sources of EA. More importantly, these novel plant sources represent an alternative for the extraction of ellagitannins and EA in order to prepare products for functional foods or nutraceuticals. These results will help in the development of new bioprocesses enhancing the release and recovery of EA.

Quantification of EAs has been previously reported in the literature (see Introduction). However, all these methods are tedious, and are not reproducible when complex organic materials are analysed. Moreover, most samples analysed contain a mix of phenols that could interfere with the EA detection. The presented methodology is simple and reproducible and results in fast estimation of the EA content in diverse plant materials.

Many techniques for the purification of EA have been developed, including the use of chromatography resins such as Dianion LP-20 or Sephadex LH-20 (Seeram et al., 2005; Machado et al., 2002; Asamy et al 2003), Sep-Pak tC18 or Bond Elut PSA cartridges (Elkhateeb et al., 2005). The method reported in this study is easy, fast and cheap as compared to these methods. This method takes advantage of the insolubility of EA in water, facilitating its precipitation and recovery. The pre-treatment of the sample achieved in the present study results in the removal of compounds that could interfere with the analysis.

Acknowledgements. This study was part of a research project financed by the Mexican program Fondo Sectorial SEP-CONACYT-51360. A. Aguilera-Carbo thanks the CONACYT for the fellowship assigned and also the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro for integral support.

References

- 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. DOI: 10.1093/jac/48.4.487.
- Amakura, Y., Okada, M., Tsuji, S., & Tonogai, Y. (2000). Determination of phenolic acids in fruit juices by isocratic column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 891, 183–188. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00625-7.
- Asamy, Y., Ogura, T., Otake, N., Nishimura, T., Xincheng, Y., Sakurai, T., Nagasawa, H., Sakuda, S., & Tatsuta, K. (2003). Isolation and synthesis of a new bioactive ellagic acid derivatives from *Combretum yunnanensis*. *Journal of Natural Products*, 66, 729–731. DOI: 10.1021/np030041j.
- Atta-Ur-Rahman, Ngounou, F. N., Choudhary, M. I., Malik, S., Makhmor, T., Nur-E-Alam, M., Zareen, S., Lontsi, D., Ayafor, J. F., & Sondengam, B. L. (2001). New antioxidant and antimicrobial ellagic acid derivatives from *Pteleopsis hylodendron*. *Planta Medica*, 67, 335–339. DOI: 10.1055/s-2001-14306.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Rosenblat, M., Volkova, N., Kaplan, M., Coleman, R., Hayek, T., Presser, D., & Fuhrman, B. (2000). Pomegranate juice consumption reduce oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in human and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 1062–1076. Retrieved from <http://www.ajcn.org/cgi/content/full/71/5/1062>.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., & Ravi Kumar, M. N. V. (2006). Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 206–210. DOI: 10.1016/j.jpba.2005.07.006.
- Barch, D. H., Rundhaugen, L. M., Stoner, G. D., Pillay, S. N., & Rosche, W. A. (1996). Structure-function relationships of the dietary anticarcinogen ellagic acid. *Carcinogenesis*, 17, 265–269. DOI: 10.1093/carcin/17.2.265.
- Bianco, M.-A., Handaji, A., & Savolainen, A. (1998). Quantitative analysis of ellagic acid in hardwood samples. *The Science of the Total Environment*, 222, 123–126. DOI: 10.1016/S0048-9697(98)00294-0.
- Carraway, R. E., Hassan, S., & Cochrane, D. E. (2004). Polyphenolic antioxidants mimic the effects of 1,4-dihydropyridines on neurotensin receptor function in PC3 cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309, 92–101. DOI: 10.1124/jpet.103.060442.
- Clifford, M. N., & Scalbert, A. (2000). Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118–1125. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9.
- Elkhateeb, A., Suberki, K., Takahashi, H., Matsuura, H., Yamasaki, M., Yamato, O., Maede, Y., Katakura, K., Yoshihara, T., & Nabeta, K. (2005). Anti-babesial ellagic acid rhamnosides from the bark of *Elaeocarpus parvifolius*. *Phytochemistry*, 66, 2577–2580. DOI: doi:10.1016/j.phytochem.2005.08.020.
- El-Toumy, S. A. A., & Rauwald, H. W. (2002). Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Phytochemistry*, 61, 971–974. DOI: 10.1016/S0031-9422(02)00435-1.
- El-Toumy, S. A. A., & Rauwald, H. W. (2003). Two new ellagic rhamnosides from *Punica granatum* heartwood. *Planta Medica*, 69, 682–684. DOI: 10.1055/s-2003-411107.
- Huetz, P., Mavaddat, N., & Mavri, J. (2005). Reaction between ellagic acid and ultimate carcinogen. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 45, 1564–1570. DOI: 10.1021/ci050163c.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Torrone, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1612–1619. DOI: 10.1021/jf062897a.
- Lei, Z. (2002). *Monomeric ellagitannins in oaks and sweetgum*. Ph.D. thesis. Wood Science and Forest Products, Blacksburg, Virginia, U.S.A.
- Machado, T. B., Leal, I. C. R., Amaral, A. C. F., Dos Santos, K. R. N., Da Silva, M. G., & Kuster, R. M. (2002). Antimicrobial ellagitannin of *Punica granatum* fruits. *Journal*

- of *Brazilian Chemical Society*, 13, 606–610. Retrieved from http://jbcs.sbq.org.br/jbcs/2002/v13_n5/09.pdf.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747. Retrieved from <http://ajcn.org/cgi/reprint/79/5/727>.
- Park, E. K., Kim, M. S., Lee, S. H., Kim, K. H., Park, J.-Y., Kim, T.-H., Lee, I.-S., Woo, J.-T., Jung, J.-C., Shin, H.-I., Choi, J.-Y., & Kim, S.-Y. (2004). Furosin, an ellagitannin, suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation and through inhibition of MAP kinase activation and actin ring formation. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 325, 1472–1480. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.10.197.
- Seeram, N., Lee, R., Ardí, M., & Herber, D. (2005). Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate husk, a by-product of the commercial juice industry. *Separation and Purification Technology*, 41, 49–55. DOI: 10.1016/j.seppur.2004.04.003.
- Sharma, S., Wyatt, G. P., & Steele, V. E. (1997). A carcinogen-DNA binding assay as a biomarker screen for identifying potential chemopreventive agents. *Methods in Cell Science*, 19, 45–48. DOI: 10.1023/A:1009798621899.
- Singh, B., Bhat, T. K., & Singh, B. (2003). Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5579–5597. DOI: 10.1021/jf021150r.
- Stoner, G. D., & Gupta, A. (2001). Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 22, 1737–1746. DOI: 10.1093/carcin/22.11.1737.
- Treviño-Cueto, B., Luis, M., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez, R., Aguilera, A., & Aguilar, C. N. (2007). Gallic acid and tannase accumulation during fungal solid state culture of a tannin-rich desert plant (*Larrea tridentata* Cov.). *Bioresourse Technology*, 98, 721–724. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.015.
- Varadkar, P., Dubey, P., Krishna, M., & Verma, N. C. (2001). Modulation of radiation-induced protein kinase C activity by phenolics. *Journal of Radiological Protection*, 21, 361–370. DOI: 10.1088/0952-4746/21/4/304.
- Wang, X., Germansderfer, A., Harms, J., & Rathore, A. S. (2007). Using statistical analysis for setting process validation acceptance criteria for biotech products. *Biotechnology Progress*, 23, 55–60. DOI: 10.1021/bp060359c.