

JBCT - JOURNAL OF BIOPROCESS AND CHEMICAL TECHNOLOGY, año 2019 Volumen 11, No 22, semestre julio - diciembre de 2019, es una publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Coahuila, a través de la Coordinación General de Estudios de Posgrado e Investigación. Edificio D planta alta Camporredondo, Saltillo, Coahuila, C.P. 25020, tels.: (844) 4-14-85-82 y 4-10-02-78.

www.biochemtech.uadec.mx/

Journal of Bioprocess and Chemical Technology

Editor Responsable Mónica L. Chávez González. Reserva de Derechos al uso exclusivo No. 04-2019-011112445500-203 **ISSN:** (*en trámite*), ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este Número, Departamento de Divulgación y Comunicación Digital de la Dirección de Investigación y Posgrado UA de C, Ing. Carlos F. Robledo Flores, Edificio "D" planta alta, unidad Camporredondo, Saltillo, Coahuila, C.P. 25280, fecha de última modificación, 01 de julio de 2019.

CONSEJO EDITORIAL

Editores en Jefe:

Dra. Mónica L. Chávez González
Dra. Adriana C. Flores Galleos
Dr. Juan A. Ascacio Valdes

Consejo Editorial:

Dr. Cristóbal N. Aguilar González, Dr. José Luis Martínez Hernández, Dr. David Castro Lugo.

Comité editorial:

Dra. Claudia Magdalena López Badillo, Dra. Anilu Rubio Ríos, Dra. Aidé Sáenz Galindo, Dr. Leonardo Sepúlveda Torre

Comité técnico editorial nacional e internacional

Dr. Damaso Navarro Rodríguez (**Materiales Avanzados Centro de Investigación en Química Aplicada**); Dr. Sylvain Guyot Agroquímica (**INRA-Unité de Recherches Cidricoles, Biotransformation des Fruits et Légumes. Francia**); Dra. Arely Prado Barragán (**Bioreactores y Fermentaciones Universidad Autónoma Metropolitana**); Dr. Deepak Kumar Verma (**Department of Agricultural and Food Engineering. Indian Institute of Technology**); Dra. Virginia Nevárez Moorillón (**Biotecnología Universidad Autónoma de Chihuahua**); Dr. Zainul Akmar Zakaria (**Chemistry & Engineering. Universiti Teknologi Malaysia**); Dra. Anna Iliina Dimitrevna (**Nanomateriales y Biotecnología Universidad Autónoma de Coahuila**); Dra. Liliana Serna (**Ciencia y Tecnología de Alimentos Universidad Nacional de Colombia**); Dr. Romeo Rojas Molina (**Ciencia y Tecnología de Alimentos Universidad Autónoma de Nuevo León**); Dra. Gisela Tubio (**Biotecnología Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario**); Dr. José Juan Buenrostro Figueroa (**Ciencia y Tecnología de Alimentos Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.**); Dr. Miguel Cerqueira (**Nanomateriales International Iberian Nanotechnology Laboratory. Portugal**); Dr. Miguel Ángel Aguilar González (**Materiales Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN**); Dr. Sócrates Palacios (**Revalorización de residuos Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL). Ecuador**); Dr. Miguel Velázquez Manzanares (**Química Analítica Universidad Autónoma de Coahuila**); Dra. Alessandra Napolitano (**Biomateriales University of Naples Federico II. Italia**); Dr. Nagamani Balagurusamy (**Catálisis enzimática y fermentaciones Universidad Autónoma de Coahuila**); Dr. José A. Teixeira (**Ingeniería Bioquímica University of Minho. Portugal**); Dr. Luis Víctor Rodríguez Durán (**Bioprocesos Universidad Autónoma de Tamaulipas**); Dr. Sevastianos Roussos (**Biotecnología y Biorremediación Université Paul Cezanne, Francia**); Dr. Jorge Enrique Wong Paz (**Bioprocesos Instituto Tecnológico de Ciudad Valles**); Dr. Luis Bermudez Humarán (**microbiología e Inmunología MICALIS Institute. INRA, Francia**); Dr. Shiburaj Sugathan (**Mirobiology Jawaharlal Nehru Tropical Botanic Garden and Research Institute. India.**); Dr. Sabu Abdulhameed (**Biotecnología y Microbiología. Kannur University**)

Journal of Bioprocess and Chemical Technology
Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila
Volumen 11, No. 22, Julio – Diciembre de 2019

Contenido

Editorial

Mónica L. Chávez González

Péptidos Bio-funcionales: bioactividad, producción y aplicaciones.

Bio-functional peptides: bioactivity, production and applications.

Martínez-Medina, G.A., Prado-Barragán, A.b, Martínez-Hernández, J.L.a, Ruíz, H.A.a, Rodríguez, R.M., Contreras-Esquivel, J.C., Aguilar, C.N.

Valor Funcional de Bebidas Tradicionales con Posible Potencial Prebiótico

Functional Value of Traditional Beverages with Possible Prebiotic Potential

Martínez-Cervantes, M. A., Wong-Paz, J. E., Aguilar-Zárate, P., Muñiz-Márquez, D. B.

Producción de Enzimas de *Trichoderma harzianum* por Fermentación de Residuos Lignocelulósicos

Production of *Trichoderma harzianum* Enzymes by Fermentation of Lignocellulosic Residues

*Gómez-García, R.1, Roussos, S.3, Medina-Morales, M. A.1, Farruggia, B.2, Pico, G.2 and Aguilar, C. N.1**

Editorial

Al equipo Editorial de JBCT nos es grato presentarles el sexto número del Journal of BioProcess and Chemical Technology, en esta ocasión tendrán la oportunidad de conocer a detalle lo que son los péptidos bio-funcionales y como estos conforman una alternativa novedosa dentro del área farmacéutica y alimentaria. Además podrán encontrar información acerca del valor funcional de bebidas tradicionales en México y como éstas pueden ser un coadyuvante en la salud. Y para cerrar el número tendrán oportunidad de conocer acerca de la producción de enzimas a partir de un hongo utilizando residuos agroindustriales empleando sistemas fermentativos.

Esperamos que este quinto número de JBCT sea de su agrado.

Dra. Mónica L. Chávez González

Valor Funcional de Bebidas Tradicionales con Posible Potencial Prebiótico

Functional Value of Traditional Beverages with Possible Prebiotic Potential

Martínez-Cervantes, M. A.¹, Wong-Paz, J. E.¹, Aguilar-Zárate, P.¹, Muñiz-Márquez, D. B.¹ *

*ITecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Ciudad Valles. Departamento de Ingenierías. Carretera Al Ingenio Plan de Ayala, Km. 2, Col. Vista Hermosa, 79010, Ciudad Valles, San Luis Potosí, México. E-mail: diana.marquez@tecvales.mx **

Resumen

Debido a los problemas de salud que se presentan hoy en día a nivel mundial, las investigaciones se han enfocado en el desarrollo de estrategias para la prevención de enfermedades, algunas de ellas relacionadas con la alimentación y el bienestar del consumidor. El tema de alimentos y bebidas funcionales ha tenido mucho impacto en los últimos años, ya que estos productos presentan un alto potencial aunado a los grandes beneficios que aportan a la salud. En México, existe una gran diversidad de bebidas tradicionales fermentadas que son obtenidas de diferentes materias orgánicas. En este sentido, existen bebidas funcionales con pre- y probióticos las cuales podrían emplearse para la prevención de enfermedades gastro-intestinales, la disminución del riesgo de cáncer de colón y algunas otras afecciones. El objetivo de este artículo de revisión es proporcionar información al lector acerca de la importancia del consumo de bebidas fermentadas con posible efecto funcional, debido a su contenido de prebióticos y/o probióticos. También se abordan ejemplos de bebidas fermentadas tradicionales las cuales han sido poco estudiadas por lo que podrían ser utilizadas para la formulación y desarrollo de nuevos productos en la industria alimentaria.

Palabras clave: Alimentos funcionales, prebióticos, probióticos, bebidas funcionales tradicionales.

Abstract

Due to the health problems that occur today worldwide, research has focused on the development of strategies for the disease prevention, some of them related to food and consumer welfare. The issue of functional foods and beverages has had a great impact in recent years, as these products have a high potential coupled with the great benefits they bring to health. In Mexico, there is a great diversity of traditional fermented beverages that are obtained from different organic materials. In this sense, there are functional beverages with pre- and probiotics which could be used for the prevention of gastrointestinal diseases, the reduction of the risk of colon cancer and some other conditions. The objective of this review article is to provide information to the reader about the importance of consuming fermented beverages with possible functional effect, due to their content of prebiotics and / or probiotics. Examples of traditional fermented beverages are also discussed, which have been little studied so they could be used for the formulation and development of new products in the food industry.

Keywords: Functional foods, prebiotics, probiotics, traditional functional beverages.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales son alimentos convencionales que se consumen como parte de la dieta diaria ejerciendo efectos benéficos al consumidor mejorando su calidad de vida (El Sohaimy, 2012; Reis y col., 2017). Según Annunziata y col. (2013) un alimento funcional es aquel alimento enriquecido con uno o más ingredientes bioactivos que proporcionan un beneficio a la salud del consumidor. Dentro de estos componentes bioactivos, se encuentran los compuestos prebióticos y los microorganismos probióticos siendo éstos, unos de los más importantes. Los prebióticos se definen como compuestos de tipo carbohidrato no digeribles que funcionan como estimulantes del crecimiento y proliferación de bacterias selectivas (probióticos) que se encuentran en el tracto gastrointestinal, mientras que los probióticos son bacterias benéficas que se encuentran en la zona intestinal y que al entrar en contacto con un prebiótico se estimulan y se multiplican para eliminar a la carga microbiana patógena presente en la zona intestinal del individuo (Dwivedi y col., 2014).

De acuerdo con Ranadheera y col. (2010) los probióticos pueden mantener un buen equilibrio en la composición de la flora intestinal, por lo cual aportan diferentes beneficios para la salud ayudando a aumentar la capacidad del organismo para resistir a la presencia de patógenos mejorando el sistema inmunológico, contribuyendo en la reducción de la intolerancia a la lactosa, en la reducción de colesterol sérico, actividad anticancerígena y mejor utilización de nutrientes y minerales. Por lo tanto, el propósito de este artículo es dar a conocer la importancia de la integración de alimentos y bebidas funcionales como parte de la dieta diaria del consumidor. También se incluye una sección de bebidas tradicionales con una posible fuente potencial de prebióticos y probióticos las cuales pudieran ser empleadas para la formulación de nuevos productos alimentarios.

ALIMENTOS FUNCIONALES

De acuerdo con Annunziata y col. (2013) los alimentos funcionales son aquellos que, dentro de sus compuestos, tienen ingredientes añadidos tecnológicamente con el fin de mejorar sus características nutricionales y así brindar un beneficio específico para la salud del consumidor. Según Martínez y col. (2017) los alimentos funcionales que contienen prebióticos y probióticos, es decir, alimentos simbióticos, imparten efectos benéficos a la salud modulando la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal, siendo esto de gran importancia ya que en la actualidad existen aproximadamente 25 enfermedades o síndromes que se atribuyen a una microbiota intestinal alterada, algunas de ellas son la obesidad, diabetes y enfermedades intestinales como el cáncer de colón, colitis

ulcerosa, síndrome del intestino irritable, entre otras. Dentro de estos productos alimentarios, existen bebidas funcionales, generalmente productos lácteos como la leche y el yogurt, a los cuales se les suministran cultivos probióticos para que sean considerados como bebidas funcionales. Sin embargo, con el incremento de personas vegetarianas e intolerantes a la lactosa, se ha optado por formular bebidas a base de jugos de frutas, ya que éstos contienen nutrientes beneficiosos como oligosacáridos que pueden ser metabolizados por microorganismos probióticos para su crecimiento y multiplicación, además se ha reportado que estas bebidas son agradables para la mayoría de las personas de todas las edades (Pimentel y col., 2015).

ALIMENTOS FUNCIONALES versus NUTRACÉUTICOS

Según Reis y col. (2017) los *alimentos funcionales* son productos que contienen ingredientes bioactivos tales como prebióticos, probióticos, antioxidantes, vitaminas, minerales y ácidos grasos de manera natural o bien, que son adicionados intencionalmente a los alimentos para elaborar un producto funcional. Estos productos, se consumen como parte de la dieta normal del consumidor y se ha evidenciado que provocan efectos positivos a la salud, independientemente de cumplir las funciones de nutrición, éstos ayudan a mejorar la calidad de vida de los consumidores. Por otra parte, los *nutracéuticos* de acuerdo a De Felice en 1989, se definen como un alimento o parte de un alimento capaz de brindar beneficios médicos, desde la prevención hasta el tratamiento de una enfermedad (Reis y col., 2017) y que es suministrado de forma farmacológica, por ejemplo, en forma de cápsulas que a su vez contienen el ingrediente activo de forma concentrada (El Sohaimy, 2012). Por lo tanto, la diferencia entre alimento funcional y un nutracéutico, es que el primero se consume como parte de la alimentación diaria con el propósito de prevenir el riesgo de enfermedades mientras que el nutracéutico se suministra en forma farmacológica como cápsulas, tabletas, píldoras o jarabe que contienen el ingrediente activo (resveratrol, curcumina etc.) para brindar un tratamiento a alguna enfermedad. Sin embargo, no por esta razón se deben de considerar como medicamentos, ya que los medicamentos se administran en dosis precisas y bajo supervisión médica y los nutracéuticos se consideran como suplementos dietéticos concentrados (Reis y col., 2017).

PREBIÓTICOS

De acuerdo con Vergara y col. (2010), los prebióticos son ingredientes funcionales de tipo carbohidrato que no pueden ser digeridos por el organismo, pero que se consideran benéficos para la salud ya que presentan diferentes propiedades biológicas, destacando su potencial para la inducción y estimulación de microorganismos probióticos en la zona intestinal y consecuente eliminación de la flora microbiana patógena mejorando así la salud del consumidor. Según Oliveira y González (2016), el término prebiótico se refiere a ingredientes que son fermentados por los probióticos y que cambian la composición y actividad de la flora intestinal proporcionando beneficios importantes a la salud. En este sentido, las fibras solubles se han incorporado como suplementos en muchos alimentos, incluyendo los destinados para edades infantiles como fórmulas, debido a que se ha demostrado su eficiencia y calidad en la disminución del riesgo de contraer alguna enfermedad gastrointestinal, además de los beneficios que aportan y por sus efectos inmunomoduladores (Sharma y col., 2016). Estos compuestos, también tienen la capacidad de mejorar la absorción de minerales del cuerpo tales como, calcio, hierro y zinc, disminuyen el riesgo de contraer cáncer de colon, bajan los niveles de triglicéridos en sangre, así como de colesterol malo (Dwivedi y col., 2014) (Figura 1).

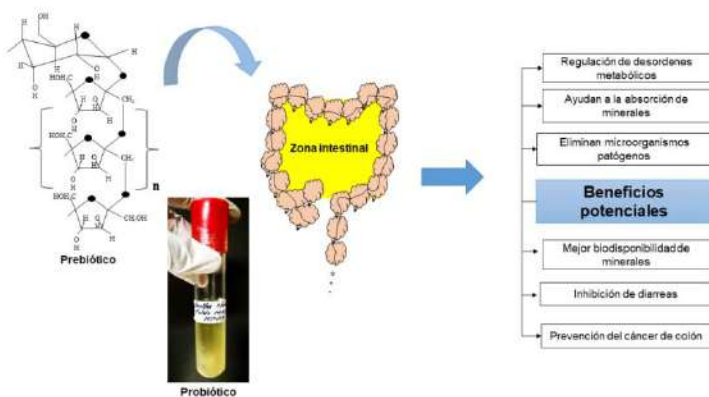


Figura 1. Beneficios potenciales de los pre- y probióticos a la salud del consumidor.

Las fibras solubles dietéticas que llegan intactas al intestino grueso y después de su ingesta son fermentadas por microorganismos probióticos de tal manera que se producen ácidos grasos de cadena corta (AGCC) tales como ácido acético, butírico, propiónico, lactato, mismos que se absorben en la zona intestinal impidiendo el establecimiento de microorganismos potencialmente patógenos los cuales no sobreviven por el descenso del pH (Dwivedi y col., 2014). Sin embargo, no solo ayudan a mantener la salud de la flora intestinal, sino que también actúan como agentes terapéuticos contra otras enfermedades, además, se pueden emplear como

aditivos para productos de la industria alimentaria, particularmente en la industria láctea y la confitería (Jayapal y col., 2013).

CLASIFICACIÓN DE COMPUESTOS PREBIÓTICOS

Los prebióticos se definen como cadenas de oligosacáridos, los cuales son clasificados de acuerdo con tipo de azúcar presente, siendo los más destacados los Galactooligosacáridos (GOS), Fructooligosacáridos (FOS), Xilooligosacáridos (XOS), entre otros.

Fructooligosacáridos (FOS)

Los fructooligosacáridos (FOS) son conocidos también como oligofruktanos, los cuales son moléculas de fructosa unidas mediante enlaces β -2-1 a una molécula de sacarosa. Los FOS presentan diversas propiedades biológicas, entre las cuales se destaca la capacidad de promover una buena absorción de minerales en el organismo, la regulación de los niveles de colesterol y glucosa en la sangre. Además, estos compuestos son importantes en el metabolismo del ser humano ya que inducen al crecimiento y proliferación de microorganismos probióticos en el tracto intestinal y de esta manera influyen en la prevención del cáncer de colon (Muñiz y col., 2016). Por lo cual, es necesario una ingesta diaria de FOS como parte de una alimentación saludable, pues proporcionan diferentes beneficios a la salud, principalmente por sus propiedades anticancerígenas, antimicrobianas, hipolipemiantes e hipoglucemiantes, además de la absorción de minerales y el combate de enfermedades como la osteoporosis y la diabetes (Davim y col., 2015).

Galactooligosacáridos (GOS)

Los Galactooligosacáridos (GOS) son oligómeros de galactosa unidos a un extremo de glucosa, los cuales son sintetizados a partir de la lactosa (Mussatto y col., 2007). Al igual que los FOS, los GOS también pueden ser incorporados a diferentes alimentos o jugos de frutas como parte de la dieta normal del consumidor. Algunas investigaciones han demostrado que el consumir GOS propicia el crecimiento y actividades de bacterias del género *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y de igual manera que los FOS, facilitan la absorción de minerales tales como el calcio, magnesio y hierro e inhiben la adición de las bacterias patógenas al epitelio colónico (Searle y col., 2009).

Xilooligosacáridos (XOS)

De acuerdo con Milessi y col. (2015) los xilooligosacáridos (XOS) son oligómeros compuestos de 2 a 10 monómeros de xilano, con propiedades funcionales y nutraceuticas. Los XOS también contienen propiedades nutraceuticas que favorecen el desarrollo de probióticos en el tracto intestinal del humano. En ocasiones tienen mayores ventajas funcionales sobre otros oligosacáridos, sin embargo, debido a su alto costo disminuye su uso en bioprocesos para la producción de bebidas funcionales y otros tipos de productos como los nutraceuticos. Según Jayapal y col. (2013), los XOS se encuentran en productos alimentarios tales como la miel de abeja, frutas y verduras, melaza, jugo y bagazo de caña, brotes de bambú, etc.

Por otra parte, los probióticos son bacterias selectivas que habitan en el colon con la capacidad de actuar sobre los compuestos prebióticos en dicha zona intestinal y de esta manera secretan una diversa variedad de metabolitos que son tóxicos para la microflora patógena que se encuentra presente. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) el término *probiótico* se refiere a microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidad adecuada ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped (Oliveira y González 2016). También son llamados microorganismos buenos o saludables, pues éstos ayudan a mantener en buen estado al aparato digestivo limitando el crecimiento de bacterias potencialmente peligrosas. Además, reducen el riesgo de contraer diversas enfermedades, por ejemplo, aquellas relacionadas con el colesterol malo, intolerancia a lactosa, diarrea, colitis, cáncer y obesidad principalmente (Figura 1). En cuanto a la obesidad, se ha documentado que esta enfermedad está relacionada con una microflora intestinal saludable, es decir, se ha comprobado que pacientes con obesidad tienen una microflora diferente a la de los pacientes que no cuentan con este padecimiento (Dwivedi y col., 2014). Esto es debido a que la microbiota intestinal alterada está ligada a trastornos metabólicos, como la sobrecarga nutricional (Tarantino y col., 2015). De acuerdo con Palomar y col. (2017) los probióticos mejoran la barrera intestinal que obstaculiza la actividad de las células innatas que se encuentran en el intestino. Algunos estudios demostraron que el consumo de *Lactobacillus casei* reduce los trastornos metabólicos que inducen la obesidad. Una de las bacterias conocidas como probióticas son las bifidobacterias, ya que éstas habitan en el intestino humano y contribuyen fuertemente en la prevención de infecciones intestinales e intolerancia a la lactosa, no obstante, la supervivencia de las bifidobacterias en productos como bebidas y alimentos funcionales es un reto, debido a que estos microorganismos son muy sensibles al oxígeno y tratamientos térmicos durante el procesado de los alimentos (Rodríguez y col., 2007). Actualmente los productos más usados para suministrar probióticos al organismo del consumidor son productos lácteos como el yogurt y las leches fermentadas. Estos

productos son inoculados con microorganismos vivos del género *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Streptococcus* sp. y *Lactococcus* sp., entre otros (Oliveira y col., 2017). No obstante, se pueden utilizar otro tipo de productos o subproductos como base para formular bebidas funcionales las cuales contengan prebióticos y probióticos, por ejemplo jugos y néctares derivados de frutas y vegetales tales como el néctar de tuba y agua de coco ambos obtenidos de la palma de coco (*Cocos nucifera*), jugo de caña (*Saccharum officinarum*), fermentado de piña (*Ananas comosus*), aguamiel de maguey (*Agave salmiana*), jugo de zanahoria (*Daucus carota*) etc. debido a los azúcares que estos productos contienen, por lo tanto, es probable que dentro de sus compuestos se encuentren oligosacáridos como FOS, GOS, XOS, inulina, lactulosa, o bien que puedan ser sintetizados por probióticos usando estos jugos como sustrato.

BEBIDAS CON POSIBLE EFECTO FUNCIONAL

En México existe una gran diversidad de alimentos y bebidas tradicionales fermentadas con importancia cultural, las cuales han sido poco estudiadas. El pulque, el pozol y el tesguino son ejemplos de bebidas típicas que han sido consumidas por años y están muy relacionadas con la cultura mexicana ya que han ganado gran interés por las comunidades indígenas. Se sabe, que las civilizaciones mesoamericanas han fermentado una gran diversidad de plantas, frutas y cereales para la producción y consumo de bebidas fermentadas las cuales han jugado un rol muy importante en los aspectos religiosos, rituales y de curación desde la época prehispánica. En los tiempos actuales el estudio de este tipo de bebidas ha sido retomado debido a que los efectos medicinales que se les han atribuido podrían estar asociados con los microorganismos que participan en los procesos de fermentación muchos de ellos con potencial probiótico. Por lo tanto, la investigación de este tipo de bebidas podría ofrecer un valor agregado al obtener un efecto benéfico para el consumidor (Romero-Luna y col. 2017). A continuación, se describen algunas bebidas fermentadas con posible efecto funcional.

Tuba, bebida obtenida de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.)

La palma de coco (*Cocos nucifera* L.) ha sido un árbol importante en el desarrollo de bebidas, ya que de éste se extraen jugos naturales, como el agua de coco alojada en la fruta y el agua de tuba extraída de la savia de la planta. Estos jugos se han catalogado por ser eficientes en la formulación de bebidas funcionales debido a los azúcares que contienen y se ha comprobado que dentro de estos azúcares existen moléculas prebióticas útiles para el desarrollo y crecimiento de microorganismos probióticos. También se ha documentado

que es importante su consumo debido a que dentro de los beneficios que se le han atribuido a la tuba, se destacan los altos contenidos de vitamina C, proteínas, aminoácidos y minerales que ésta presenta (Stringini y col., 2009; Cabezas-Elizondo, 2016). La tuba es obtenida principalmente en el estado de Colima, Michoacán y Guerrero en México donde existen alrededor de 300 000 cocoteros enfocados a esta actividad de obtención de la savia, además de la República de Filipinas en donde es consumida como bebida refrescante. A partir de esta bebida, también se pueden obtener subproductos como el vinagre o bien, una bebida de hasta 4% de alcohol mediante fermentaciones naturales en donde predominan microorganismos del género *Saccharomyces*, bacterias ácido lácticas y bacterias ácido acéticas. La tuba, es una bebida con características similares al pulque que se obtiene del aguamiel de maguey ya que son semejantes en cuanto al color, viscosidad, olor y sabor. Para extraer la savia se aprovechan las inflorescencias tiernas (con una altura de 45 a 75 cm de largo) y aun cuando las cubre la espata, la extracción de la savia se da al doblar el eje para que el líquido fluya libremente a partir del corte que se le hace con la precaución de no romper el racimo floral (Granados-Sánchez y López-Ríos, 2002). Cuando la savia es extraída de la palma es de coloración parda o ámbar, después de algunas horas y debido a la presencia de una gran variedad de microorganismos se torna de un color blanquecino, manteniendo sus características organolépticas peculiares hasta un tiempo de 2 horas post cosecha. Pasado un lapso de aproximadamente cinco horas inicia el proceso de fermentación natural, pero si se deja reposar durante más de 10 horas a temperatura ambiente se pueden obtener productos fermentativos como por ejemplo el vinagre y aguardiente (Velázquez y col., 2011).

Aguamiel de maguey (*Agave sp.*)

El aguamiel de maguey es un jugo rico en azúcares dentro de los cuales se encuentran compuestos prebióticos como los fructooligosacáridos (Muñiz y col., 2016). Esta savia, es obtenida de algunas especies de agaves, tales como *Agave salmiana*, *Agave americana*, *Agave atrovirens* entre otros. De acuerdo con Carranza y col. (2014) la planta de *Agave* pertenece a la familia *agavaceae*, la cual se encuentra principalmente en el norte y centro de América, siendo México uno de los mayores productores con aproximadamente 251 especies de agaves. La savia es obtenida de magueyes en edad madura, haciendo una cavidad central de aproximadamente 20-30 cm derivada del corte de las hojas tiernas (capación). Posteriormente, este orificio es raspado con la finalidad de que la savia (aguamiel) fluya hacia el exterior, logrando acumularse alrededor de 1000 a 1500 L en un periodo de 3-6 meses (Muñiz-Márquez y col., 2013). Los fructanos presentes en el aguamiel se consideran prebióticos debido a que no son digeribles ante la acción de enzimas presentes en el tracto intestinal, por lo que estos

compuestos pasan íntegros al colon donde son fermentados por los probióticos, brindando de esta manera, múltiples beneficios para la salud del consumidor (Moreno y col., 2014). Muñiz y col. (2013) mencionan que los fructanos de agave han ganado mucho interés como aditivos alimentarios debido a que han sido relacionados con la estimulación de absorción de minerales como el calcio, principalmente en la postmenopausia de la mujer, favorecen la absorción de hierro en los niños, previenen el cáncer de colon y en algunos casos se ha documentado que disminuyen el índice glucémico siempre y cuando su consumo sea moderado.

Jugo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*)

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una gramínea que requiere altas temperaturas para su desarrollo y bajas temperaturas para su maduración, cuanto más grande sea el rango entre las temperaturas bajas y altas durante la maduración de la caña se incrementará el porcentaje de obtener jugos de mejor pureza y con mayor rendimiento de azúcares. La luz solar tiene un efecto importante en el proceso de crecimiento y maduración de la caña, ya que gracias a ésta se pueden sintetizar e incrementar las concentraciones de azúcares (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1991). La extracción del jugo de caña, se puede llevar a cabo cuando la caña esté completamente madura, empleándose trapiches motorizados para el proceso de extracción. Al igual que el aguamiel de maguey y el agua de tuba, el jugo de caña se considera una bebida refrescante y energizante durante las primeras horas post cosecha debido a los azúcares que este jugo contiene, después de 10 horas hasta 48 horas las bacterias y levaduras fermentativas que el jugo de caña contiene comienzan la fermentación transformando los azúcares del jugo en alcohol, al cual se le debe de dar un proceso de destilación para obtener una bebida alcohólica conocida como ron agrícola. Los subproductos de la caña de azúcar, tales como el jugo, la melaza y el bagazo pueden contener xilanos dentro de sus compuestos, los cuales son azúcares que llegan a formar cadenas de oligómeros dando origen a los xilooligosacáridos (XOS) (Jayapal y col., 2013).

Según Jayapal y col. (2013) se ha demostrado en diferentes estudios que el uso de los XOS obtenidos de los subproductos de la caña en ocasiones es más eficiente que la utilización de FOS para mantener la salud del tracto gastrointestinal, debido a que la implementación de XOS incrementa las propiedades nutricionales y sensoriales de varios alimentos. Sin embargo, algunos de los avances más importantes en la obtención de bebidas funcionales es la caracterización de los jugos con el propósito de conocer el perfil de azúcares presentes en éstos y saber si cuenta con moléculas de alto valor agregado o si es posible sintetizarlas mediante la implementación de bioprocesos. Otro avance tecnológico importante es el poder seleccionar una bacteria adecuada para un medio o jugo específico, con la seguridad de que este microorganismo

actuará de manera satisfactoria para la biosíntesis de moléculas prebióticas (Espirito y col., 2015).

Tepache, bebida fermentada a partir de la piña (*Ananas comosus*)

El tepache es una bebida fermentada que se puede preparar con cáscaras de diversas frutas como piña, manzana, naranja y guayaba. Comúnmente en México se prepara a base de cáscaras de piña y agua purificada, a la cual se le añade piloncillo granulado para mejorar su sabor e inducir el proceso de fermentación. Existen diversas especies de microorganismos que intervienen en el proceso de fermentación del tepache, destacando la presencia de *Lactobacillus plantarum* y *Leuconostoc mesenteroides*. Esta bebida mexicana, es considerada como una bebida refrescante obtenida mediante una fermentación natural en estado líquido a una temperatura similar a la ambiental y puede ser transformada en una bebida con un ligero grado de alcohol si se deja fermentar durante varias horas (Corona y col., 2011). Algunos reportes, han documentado que el tepache cuenta con nutrientes potencialmente eficaces para la supervivencia de microorganismos probióticos, los cuales podrían desempeñar actividades importantes tales como la síntesis y producción de oligosacáridos funcionales y como consecuencia brindar beneficios a la salud del consumidor, principalmente en la prevención de enfermedades gastrointestinales así como cáncer de colon. Por otra parte, Romeo-Luna y col. (2017) mencionan que esta bebida contiene bacterias productoras de bacteriocinas (*Lc. Lactis. E. faecium*) las cuales podrían actuar como posibles fuentes de antimicrobianos naturales. Por otra parte, *Leuconostoc mesenteroides*, presente en el tepache, produce dextrano, el cual es un polímero con diversos usos en la industria de alimentos, tales como emulsificante, estabilizante y coadyuvante.

CONCLUSIONES

Es de suma importancia conocer los beneficios que proporcionan los compuestos prebióticos y los microorganismos probióticos como parte de la alimentación en la vida diaria del consumidor. Esto puede ser a partir de la ingesta de alimentos funcionales ricos en pre- y probióticos o bien, a través del consumo controlado de bebidas tradicionales mexicanas que contienen este tipo de ingredientes. El propósito de consumir este tipo de ingredientes, es para prevenir enfermedades gastrointestinales, ciertos tipos de cánceres, diabetes, intolerancia a la lactosa entre otras. Por lo cual sería interesante formular bebidas propias de México con un alto valor nutricional, funcional y de fácil acceso para diferentes poblaciones, principalmente en donde existan

problemas de desnutrición y/o alta incidencia de enfermedades crónico degenerativas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Tecnológico Nacional de México por el financiamiento otorgado para la realización del proyecto con clave 6153.19-P.

REFERENCIAS

- Annunziata A y Vecchio R. 2013. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. *Food Qual. Prefer.* **28**: 348–355.
- Cabezas-Elizondo DA. 2016. El tejuino, el bate y la tuba bebidas refrescantes: símbolos que perduran de generación en generación en el estado de Colima. *Razón y Palabra.* **20**: 89-104.
- Carranza C, Fernández A, Bustillo Armendáriz GR, y López-Munguía A. 2015. Processing of Fructans and Oligosaccharides from Agave Plants. In: *Processing and Impact on Active Components in Food*. Academic Press, USA, 121–129 pp.
- Corona-González RI, Ramos-Ibarra JR, Pelayo-Ortiz C, Guatemala-Morales MG y Arriola-Guevara E. 2011. Estudio de las condiciones óptimas de fermentación para la producción de tepache. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 1, 1.
- Davim S, Andrade S, Oliveira S, Pina A, Barroca MJ y Guiné RPF. 2014. Development of Fruit Jams and Juices Enriched with Fructooligosaccharides. *Int. J. Fruit Sci.* **15**: 100–116.
- Dwivedi S, Shahrawat K, Puppala N y Ortiz R. 2014. Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops. *Electron. J. Biotech.* **17**: 238-245.
- El Sohaimy SA. 2012. Functional foods and nutraceuticals – modern approach to food science. *World Appl. Sci. J.* **5**: 691 – 708.
- Espirito-Santo AP, Carlin F y Renard C. 2015. Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth? - A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. *Food Res. Int.* **78**: 352–360.
- Granados-Sánchez D y López-Ríos GF. 2002. Manejo de la palma de coco (*Cocos nucifera* L.) en México. *RCHSCFA* **8**: 39-48.
- Jayapal N, Samanta AK, Kolte AP, Senani S, Sridhar M, Suresh KP y Sampath KT. 2013. Value addition to sugarcane bagasse: Xylan extraction and its process optimization for xylooligosaccharides production. *Ind. Crops Products* **42**: 14–24.
- Milessi T, Kopp W, Rojas MJ, Manrich A, Baptista-Neto A, Tardioli PW y Giordano RLC. 2015. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. *Cat. Today* **259**: 130–139.

- Moreno L, García MH, Delgado-Portales RE, Corral-Fernández NE, Cortez-Espinosa N, Ruiz-Cabrera MA y Portales-Perez DP. 2014. In vitro assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. *Int. J. Biol. Macromol.* **63**: 181-187.
- Muñiz-Márquez DB, Rodríguez-Jasso RM, Rodríguez-Herrera R, Contreras-Esquivel JC, Aguilar-González CN. 2013. Producción artesanal de aguamiel: Una bebida tradicional mexicana. *AQM.* **5**: 12-19.
- Muñiz-Márquez DB, Contreras JC, Rodríguez R, Mussatto SI, Teixeira JA y Aguilar CN. 2016. Enhancement of fructosyltransferase and fructooligosaccharides production by *A. oryzae* DIA-MF in Solid-State Fermentation using aguamiel as culture medium. *Biores. Technol.* **213**: 276–282.
- Mussatto SI y Mancilha IM. 2007. Non-digestible oligosaccharides: a review. *Carbohydrate Polymers* **68**: 587-597.
- Oliveira D, Vidal L, Gastón A, M-Walter EH, Rosenthal A y Deliza R. 2017. Sensory, microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. *LWT - Food Sci. Technol.* **79**: 234-241.
- Olveira G, y González-Molero I. 2016. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *Endoc. Nutr.* **63**: 482-494.
- Palomar MM, Bru E, Maldonado GC y Perdigón G. 2017. Oral probiotics supplementation can stimulate the immune system in a stress process. *J Nutr. Inter. Metabol.* **8**: 29-40.
- Pimentel TC, Madrona GS y Prudencio S. H. 2015. Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability, *LWT - Food Sci. Technol.* **62**: 838-846.
- Ranadheera RDCS, Baines SK y Adams MC. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Res. Int.* **43**: 1-7.
- Reis FS, Martins A, Vasconcelos MH, Morales P y Ferreira ICFR. 2017. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends Food Sci. Technol.* **66**: 48-62.
- Rodríguez-Huezo ME, Durán-Lugo R, Prado-Barragán LA, Cruz-Sosa F, Lobato-Calleros C, Alvarez-Ramírez J, Vernon-Carter EJ. 2007. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. *Food Res. Int.* **40**: 1299–1306.
- Romero-Luna HE, Hernández-Sánchez H, Dávila-Ortiz G. 2017. Traditional fermented beverages from Mexico as a potential probiotic source. *Ann Microbiol.* **67**: 577-586.
- Searle LEJ, Best A, Nunez A, Salguero FJ, Johnson L, Weyer U y La Ragione RM. 2009. A mixture containing galactooligosaccharide, produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum*, reduces salmonella enteric serovar *Typhimurium* infection in mice. *J Medic. Microbiol.* **58**: 37–48.
- Sharma M, Patel SN, Lata K, Singh U, Krishania M, Sangwan RS y Singh SP. 2016. A novel approach of integrated bioprocessing of cane molasses for production of prebiotic and functional bioproducts. *Biores. Technol.* **219**: 311–318.
- Stringini M, Comitini F, Taccari M y Ciani M. 2009. Yeast diversity during tapping and fermentation of palm wine from Cameroon. *Food Microbiol.* **26**: 415–420.
- Tarantino G y Finelli C. 2015. Systematic review on intervention with prebiotics/probiotics in patients with obesity related nonalcoholic fatty liver disease. *Future Microbiol.* **45**: 889-902.
- Velázquez JM, Meléndez NP, Rodríguez R y Aguilar CN. 2011. Tuba: una bebida fermentada tradicional de Colima. *Ciencia Cierta*, 1-7.
- Vergara CM, Honorato TL, Maia GA y Rodrigues S. 2010. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *LWT - Food Sci. Technol.* **43**: 141–145.

Péptidos Bio-funcionales: bioactividad, producción y aplicaciones.

Bio-functional peptides: bioactivity, production and applications.

Martínez-Medina, G.A.^a, Prado-Barragán, A.^b, Martínez-Hernández, J.L.^a, Ruíz, H.A.^a, Rodríguez, R.M.^a,
Contreras-Esquivel, J.C.^a, Aguilar, C.N.^{a*}

a Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Unidad Saltillo. 25280, Coahuila, México.

b Departamento de Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, 09340, Ciudad de México.

**Autor para correspondencia: cristobal.aguilar@uadec.edu.mx*

Resumen

Los péptidos bio-funcionales son moléculas que, debido a sus propiedades biológicas, representan una alternativa atractiva, novedosa y original, dentro del área farmacéutica y alimentaria para su empleo como aditivos nutraceuticos de alto valor agregado. En la actualidad, dentro de los retos más importantes que mantiene el desarrollo de los bioprocesos para generación de péptidos son la estandarización e implementación de las metodologías de producción a escala industrial además de la purificación de estos compuestos, por lo que el objetivo de este artículo de revisión es analizar y describir un panorama a detalle de la producción, propiedades biológicas y aplicaciones de los péptidos bio-funcionales.

Palabras clave: Aplicaciones, péptidos bio-funcionales, propiedades biológicas, producción.

Abstract

Bio-functional peptides are molecules with biological properties which represent an attractive, innovative and original alternative in the pharmaceutical and food industries for use as nutraceutical additives with high added value. In the last decade, one of the most important challenges is the standardization and methodologies implementation for peptides industrial scale production and further purification. The purpose of this article revision is to have a close look on the production, biological properties characterization and possible applications described so far on bio-functional peptides.

Keywords: Applications, biological properties, bio-functional peptides, production.

INTRODUCTION

La relación entre alimento y la salud ha sido reconocida desde el año 450 A.C., tiempos de Sócrates, quien indicó “has de tu alimento, tu medicina” (Hasler 2002), derivado de este concepto han surgido términos como “nutracéutico” o “alimento funcional”. De acuerdo con el IFT (Institute of Food Thechnologist) un alimento funcional es un componente que provee además de la nutrición básica, un beneficio en la salud. Estos componentes pueden proporcionar elementos esenciales en cantidades que sobrepasan las necesarias para el mantenimiento, crecimiento y desarrollo normal de un individuo; además de aportar otros componentes biológicamente activos que imparten efectos fisiológicos deseables en la salud (Hasler & Brown 2009). Mientras que un nutraceutico, de acuerdo

a la Farmacopea Canadiense es un producto aislado o purificado a partir de un producto alimentario, que generalmente se vende en una formula farmacéutica y que se ha demostrado que proporciona efectos fisiológicos positivos o una función preventiva o protectora en contra de una enfermedad crónica (Cicero *et al.*, 2015).

Las proteínas representan un componente alimentario integral, que provee de aminoácidos esenciales que proporcionan energía para el crecimiento y mantenimiento de un individuo sano; además algunas proteínas poseen actividades biológicas específicas, haciéndolas potenciales ingredientes de alimentos funcionales (de Castro *et al.*, 2014). Estudios recientes en la investigación de alimentos funcionales, tienen especial interés en los compuestos bioactivos incluyendo los péptidos bioactivos (Kadam *et al.*, 2015), este término incluye a las secuencias cortas de aminoácidos que van de 2 a 40 unidades de aminoácidos que

son inactivos dentro de la proteína precursora, sin embargo, al ser liberados durante la digestión pueden ejercer una variedad de actividades biológicas (Carrasco-Castilla *et al.*, 2012).

Los péptidos bioactivos pueden ser liberados por hidrólisis o procesos fermentativos, y son generados a partir de diferentes fuentes proteicas, como lo son proteínas de origen animal, entre los que encontramos, sangre de bovino, gelatina, carne, huevo, algunos peces como la sardina y el salmón, o bien de fuentes vegetales como trigo, maíz, soja, arroz, hongos, calabaza y sorgo (Möller *et al.*, 2008). Las secuencias aminoacídicas de los péptidos le confieren distintas propiedades biológicas además algunos péptidos pueden ser multifuncionales (Erdman *et al.*, 2008). Los péptidos biológicamente activos pueden mostrar actividades antioxidantes, antihipertensivas, e inmunomoduladoras, antimicrobianas, antifúngicas y anticoagulantes (Saadi *et al.*, 2015).

Después de la administración oral los péptidos pueden actuar de manera local en el sistema gastrointestinal o pueden sobrepasarlo e impactar en tejidos periféricos a través del sistema circulatorio y ejercer sus propiedades fisiológicas directamente en el sistema cardiovascular, digestivo, inmunológico e incluso en el sistema nervioso (Mulero-Cánovas *et al.*, 2011); y por lo tanto puede llegar a ejercer un efecto terapéuticos y actuar como alternativa a otras moléculas farmacológicas en los sistemas del organismo; ofreciendo numerosas ventajas sobre los métodos farmacológicos convencionales debido a sus bioactividad, bioespecificidad, amplio espectro, diversidad estructural y bajos niveles de toxicidad y acumulación en tejidos del cuerpo (Agyei *et al.*, 2011).

BIOFUNCIONALIDAD

Los péptidos funcionales derivados de proteínas de origen alimentario han sido estudiados y presentan actividades biológicas en sistemas fisiológicos como el digestivo, nervioso y el sistema inmune manifestando un efecto positivo en la salud (de Castro *et al.*, 2015). Dentro de las actividades biológicas más reportadas se cuentan la actividad antimicrobiana, antihipertensiva, inmunomoduladoras y antioxidantes.

Actividad antimicrobiana

La preocupación generada por el uso excesivo de antibióticos ha motivado la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana que presente efectividad pero que conlleve a menores efectos colaterales. Los péptidos antimicrobianos son caracterizados por ser moléculas cargadas positivamente y por presentar residuos hidrófobos, que pueden actuar en contra de un amplio espectro de microorganismos en los que se incluyen bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas, virus y hongos. Existe una atracción hidrófoba entre los péptidos y la membrana citoplasmática de los microorganismos; la cual está cargada

negativamente, como resultado de esta atracción se forman poros. La actividad antimicrobiana de los péptidos también pueden actuar a través de otros mecanismos como puede ser el interrumpir procesos esenciales en la síntesis de ADN, proteínas y pared celular (Aoki *et al.*, 2012).

Actividad antihipertensiva

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), son un conjunto de padecimientos en donde el corazón y los vasos sanguíneos se ven afectados; entre las que se encuentran las enfermedades coronarias del corazón, ataques fulminantes o fallas cardíacas y además constituyen la primera causa de muerte a nivel mundial (Salehi *et al.*, 2013). Una enfermedad crónica como la hipertensión es considerada uno de los mayores riesgos para el desarrollo de algunas ECV (Ogedegbe & Pickering 2011).

La enzima convertidora de la angiotensina (ECA) es una enzima clasificada como metal-carboxidipeptidasa (EC3.4.15.1) que juega un papel sustancial dentro de los organismos, ya que a través de su acción se genera un péptido con un potente poder vasoconstrictor (Espejo de Carpio *et al.*, 2013). Para tratar la hipertensión se utilizan una serie de medicamentos sintéticos que inhiben la acción de la ECA y generalmente producen efectos secundarios; una alternativa a estos es el uso de moléculas con capacidad de inhibir la ECA a partir de fuentes de origen alimentario (Chen *et al.*, 2013).

Actividad Inmunomoduladora

Existen péptidos que poseen capacidades inmunomoduladoras como es el caso de algunos péptidos derivados de proteínas como las caseínas y el suero de leche, que tienen la capacidad de mejorar y aumentar las funciones de las células inmunes promoviendo su proliferación así como la producción de anticuerpos y citocinas (Korhonen & Pihlanto 2006). Las actividades inmunomoduladoras promovidas por los péptidos dependen de la estructura, del tipo y la carga de los aminoácidos que lo forman (Agyei & Danquah 2012), a pesar de que la mayoría de los péptidos inmunomoduladores provienen de la hidrólisis de proteínas de la leche, se buscan nuevas alternativas, por ejemplo, algunos autores demostraron la actividad inmunomoduladora de hidrolizados proteicos de huevos de pescado (Chalamaiah *et al.*, 2015).

Actividad Antioxidante

Normalmente los radicales libres son generados en el cuerpo durante la respiración, además también pueden ser producidos por estímulos externos como la contaminación, los componentes del tabaco o la radiación, estos pueden actuar en contra de infecciones, sin embargo un exceso de estas moléculas puede resultar en daños a las moléculas que forman los tejidos como ADN, proteínas y fosfolípidos que pueden resultar en el desarrollo de enfermedades como aterosclerosis, artritis, diabetes y cáncer (Sarmadi *et al.*, 2010). Por estas razones se buscan moléculas antioxidantes

mediante la estabilización de radicales y moléculas pro-oxidantes, como Senphan *et al.*, 2014 y Ahmed *et al.*, 2014 que producen hidrolizados de piel de pescado utilizando proteasas del hepatopáncreas del camarón blanco del Pacífico con actividad antioxidante *in vitro* y a partir de hidrolizados de proteínas de leche de cabra, respectivamente.

Otras bioactividades

Los péptidos bio-funcionales también, pueden presentar actividades diversas, como actividad opiácea, en donde estas moléculas presentan una afinidad por los receptores opiáceos y actúan como moduladores exógenos de actividades como liberación de hormonas, motilidad intestinal y comportamiento emocional (Alvarado-Carrasco *et al.*, 2010).

Los péptidos antihipercolesterolemicos, particularmente obtenidos de la hidrólisis de la soja, que tienen la capacidad de inhibir la absorción del colesterol, debido a la represión de la solubilidad (Mulero-Cánovas *et al.*, 2011).

PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS BIO-FUNCIONALES

Debido a la gran relevancia terapéutica que se les ha atribuido a moléculas emergentes como los péptidos bioactivos, se han desarrollado una serie de metodologías para su producción, entre los que se pueden mencionar, la síntesis química, fermentaciones microbianas o la hidrólisis enzimática *in vivo* o *in vitro* e incluso combinaciones de estas técnicas.

La comprensión de los parámetros críticos para la generación de péptidos con una actividad fisiológica en concreto es de suma importancia; entre estos parámetros podemos encontrar la fuente proteica y sus características, la secuencia y composición de aminoácidos, condiciones de proceso temperatura, pH, especificidad de la enzima, tiempo de reacción, y en el caso de péptidos de origen vegetal, también puede influir el tiempo de cosecha o época del año. El control adecuado de estos puntos puede generar péptidos multifuncionales o con una actividad biológica específica (Samaranyaka 2011, Li-Chan *et al.*, 2015).

Fermentación microbiana

La fermentación es uno de los procesos más utilizados para la generación de péptidos bio-funcionales. Las especies de bacterias ácido-lácticas (BAL) como: *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactobacillus lactis ssp. diacetyllactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris* o *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, constituyen algunos de los cultivos comúnmente utilizados. Los péptidos bioactivos pueden encontrarse en los productos lácteos de manera natural; ya que éstos contienen proteínas precursoras en la formación de péptidos fisiológicamente activos (de Castro *et al.*, 2015). Los péptidos de origen lácteo son derivados de la proteólisis generada por las BAL, las cuales, poseen un sistema

proteolítico complejo, que consiste en tres componentes principales: 1) Las proteasas que están unidas a la pared celular y que promueven la proteólisis inicial transformando las proteínas en oligopéptidos, 2) los péptidos que actúan como transportadores específicos que acarrearán péptidos al citoplasma y por último, 3) los péptidos con actividad peptidasa intracelular que transforman los oligopéptidos en péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres (Chaves *et al.*, 2014).

Se ha reportado la producción de péptidos biológicamente activos a través del proceso fermentativo utilizando no sólo BAL, si no también organismos como: *Kluyveromyces marxianus* (Hamme *et al.*, 2009), *Fusarium tricinctum* (Tejesvi *et al.*, 2013), *Bacillus subtilis* y *Bacillus brevis* (Muhammad & Ahmed 2015). También se ha reportado el desarrollo de genes sintéticos para la generación de péptidos bioactivos utilizando microorganismos como *Streptococcus thermophilus* (Renyé & Somkuti 2007) o *Escherichia coli* (Kim *et al.*, 2006) para expresarlos (Zambrowicz *et al.*, 2013).

Aunado a esto se han presentado una serie de reportes en los que se estudia la generación de péptidos bio-funcionales en alimentos fermentados tradicionales como el Kéfir (Ebner *et al.*, 2015) o el Kapi que es una pasta de camarón fermentada, de la cocina tradicional tailandesa (Kleekayai *et al.*, 2015).

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática de proteínas es una de las metodologías más utilizadas para la generación de péptidos bio-funcionales (Korhonen *et al.*, 2006), este proceso puede ser optimizado a través del control de ciertos parámetros físico-químicos como el pH o temperatura, proporcionando así las condiciones ideales para que las proteasas actúen (Kim *et al.*, 2010). Una amplia variedad de proteinasas como: quimiotripsina, alcalasa, pepsina, termolisina, e incluso enzimas de fuentes bacterianas y fúngicas; así como combinaciones de las mismas, son empleadas para producir biopéptidos (Mohanty *et al.*, 2015), generalmente a partir de sustratos proteicos de origen vegetales y animal, siendo las proteínas de leche una de las más utilizadas en la producción de moléculas bioactivas (Srinivas *et al.*, 2010); otros sustratos ampliamente utilizados son la sangre de bovino, carne, gelatina, huevo, trigo, soja, arroz, hongos, calabaza, y sorgo (Möller *et al.*, 2008), así mismo, se han obtenido péptidos con actividades biológicas a partir de sustratos de origen marino como lo son algas, pescados, moluscos, crustáceos y productos de desecho de músculos, vísceras o piel (Hung *et al.*, 2012).

Este método de manufactura de péptidos fisiológicamente activos, posee ventajas en la generación de perfiles peptídicos bien definidos; los cuales poseen una alta tasa de productividad y además no se generan moléculas que pueden dañar la salud, como sucede con la hidrólisis química, por lo

que los hace viables para su aplicación en la formulación de alimentos funcionales o nutraceuticos (Aluko 2012).

Existen metodologías que han implementado la inmovilización de enzimas durante el proceso de producción en el cual se destacan ventajas como una recuperación de enzimas sencilla y por lo tanto se permite generar productos de alta pureza (Wang *et al.*, 2014; Pedroche *et al.*, 2007).

Han sido reportados péptidos obtenidos a partir de hidrolizados proteicos de caseína o suero de leche de cabra antioxidantes e inhibidores de la ECA (De Gobba *et al.*, 2014, Espejo de Carpio *et al.*, 2013). Huang *et al.* (2015) reportaron la producción de péptidos con actividad fijadora de hierro a partir de colágeno proveniente de residuos de pescado, incluso, también se ha reportado péptidos antitrombóticos obtenidos a partir de proteínas de amaranto (Sabbione *et al.*, 2015) e incluso proteínas del huevo con actividad antimicrobiana (Abdou *et al.*, 2007).

Tecnologías alternativas

Trabajos recientes en la generación de nuevas secuencias peptídica con biofuncionalidad específica se enfocan en la búsqueda de fuentes proteicas alternativas y nuevas metodologías para la generación de péptidos.

El establecimiento de técnicas de fragmentación de proteínas como el uso de ultrasonido, el procesamiento con microondas (Kadam *et al.*, 2015), técnicas como hidrólisis con fluidos supercríticos (Rogalinski *et al.*, 2005, Asaduzzaman *et al.*, 2015) y los procesamientos con altas presiones (Toldrá *et al.*, 2011) están siendo estudiados para la generación de productos bioactivos.

El ultrasonido es definido como una onda acústica con una frecuencia mayor a 20 kHz y por lo tanto exceden los límites del oído humano; además de que se necesita un medio externo para propagarse. Estas ondas provienen de un cuerpo en vibración que al propagarse al medio que las rodea, las moléculas comienzan a oscilar y también por oscilación estas partículas transmiten la energía entre sí (Mason & Loiner 2002). La aplicación de tecnologías como el ultrasonido de alta intensidad en matrices biológicas como proteínas, implica la generación de cambios fisicoquímicos en ellas (O'donnell *et al.*, 2010), debido a los efectos mecánicos, cavitacionales y térmicos que ésta tecnología genera, como la *implosión* de burbujas cavitacionales, formación de micro jets, micro turbulencia, colisiones de alta velocidad inter partículas y la perturbación de micro poros.

La formación y las colisiones entre las burbujas cavitacionales provocan que en el medio se generan temperaturas y presiones locales altas, que van arriba de 5000 K o 500 atm, así mismo la formación de radicales, lo que resulta en una mejora en la extracción además de la aceleración de las reacciones (Kadam *et al.*, 2015), lo que puede ser aprovechado dentro de la industria de los

alimentos y la farmacéutica, por ejemplo con la hidrólisis proteica que representa un paso importante dentro de la identificación, cuantificación, caracterización de proteínas, así como en la generación de péptidos bioactivos.

Con el fin de la producción de estos componentes biofuncionales, se implementa el uso del ultrasonido como un pre tratamiento (Jia *et al.*, 2010; Zou *et al.*, 2016) o su aplicación simultánea durante la hidrólisis enzimática (Yang *et al.*, 2011), esto debido al hecho de que esta tecnología, tiene la capacidad de modificar la estructura y conformación proteica, afectando los puentes de hidrógeno o interacciones hidrofílicas y por lo tanto la estructura terciaria y cuaternaria de la misma, aunado a esto, los efectos físicos y mecánicos, provocados por el ultrasonido pueden exponer en mayor medida los sitios de hidrólisis, lo que resulta en un aumento en la susceptibilidad a la acción de las proteinasas, provocando un aumento en el grado de hidrólisis. Sin embargo, entre los efectos adversos que pueden presentarse se encuentran los daños en la conformación de la propia enzima y por lo tanto en su actividad hidrolítica (Ozuna *et al.*, 2015).

Por otra parte, tecnologías como el microondas, permiten que las moléculas que intervienen en las reacciones, oscilen bajo el campo electromagnético y ésta energía electromagnética es transformada en calor y por lo tanto hace posible que se lleven a cabo reacciones químicas (Reddy *et al.*, 2013; Budarin *et al.*, 2015), que se ven aceleradas, con rendimientos mayores y con productos altamente puros (de la Hoz *et al.*, 2005), se han reportado estudios en donde se aplica la hidrólisis enzimática e hidrólisis con álcalis asistida por este tipo de tecnologías emergentes en la generación de hidrolizados proteicos (Izquierdo *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2016), así como para la obtención péptidos con una potencial actividad biológica (Ruan *et al.*, 2014), e incluso ha sido utilizado como pre tratamiento de sustratos proteicos, previo a la hidrólisis enzimática para la generación de péptidos con bioactividad *in vitro* (Uluko *et al.*, 2015).

PROCESOS DE RECUPERACIÓN

Los procesos de separación y purificación dentro de la producción de péptidos bioactivos que permitan una recuperación exitosa de los productos representan un paso relevante dentro del proceso. La selección del método de purificación, dependen en gran medida de las metodologías que se utilizan para generarlos, así como la aplicación al que se destina y las propiedades bio-funcionales de los mismos; donde generalmente, se utilizan metodologías que son extensamente aplicadas en la purificación de proteínas como: la precipitación selectiva con solventes, las técnicas de ultrafiltración y los métodos cromatográficos (Agyei *et al.*, 2016). Propiedades como: las cargas, la variación de pesos moleculares y la afinidad de estas moléculas durante las metodologías de purificación son las barreras más grandes que se generan, es por esto que los científicos proponen

metodologías que emplean instrumentación compleja para solucionar esta serie de desafíos (Saadi *et al.*, 2015), también se han aplicado combinaciones de este tipo de metodologías por ejemplo, Lafarga *et al.* (2016) y Jin *et al.* (2016) emplearon metodologías consecutivas de ultrafiltración y técnicas cromatográficas, para la purificación de péptidos antihipertensivos y antioxidantes respectivamente; mientras que otros autores separan péptidos con aparentes propiedades anticancerígenas a través de tecnologías denominada electrodiálisis con membrana de ultrafiltración (Doyen *et al.*, 2011), la implementación de estas metodologías, tienen generalmente éxito a nivel laboratorio pero al ser escaladas, repercuten en un aumento enorme de los costos en los bio procesos para la generación de péptidos bioactivos, siendo ésta etapa donde se demanda el desarrollo de nuevos procedimientos y tecnologías que faciliten y disminuyan los costos de los mismos.

Conclusiones

El bioproceso implicado en la generación de péptidos bioactivos, engloba una serie de complicados pasos, en donde la investigación científica hace un esfuerzo por optimizar los procesos y generar nuevas técnicas de producción, así como que las bioactividades expresadas por estos compuestos *in vitro*, se mantengan después de su consumo, aunados a esfuerzos para disminuir su sabor amargo; pero sobre todo, el reto más relevante que se presenta, como en la mayoría de los bioprocesos, es el enorme gasto implicado dentro las técnicas de purificación de péptidos bio-funcionales destinados a consumo humano, cuya finalidad es ejercer un efecto positivo en la salud.

REFERENCES

- ABDOU A.M., HIGASHIGUCHI S., KIM A.M., IBRAHIM H.R. Antimicrobial peptides derived from egg lysozyme with inhibitory effect against *Bacillus* species. *Food Control* 18: 173-178. 2007.
- AHMED A.D., EL-BASSIONNY T., ELMALT L.M., IBRAHIM H.R. Identification of potent antioxidant bioactive peptides from goat milk protein. *Food Research International* 74: 80-88. 2015.
- ALUKO R.E. 2012. Functional Foods and Nutraceuticals. Chapter 3. Bioactive peptides. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-3480-1>
- ALVARADO-CARRASCO C., GUERRA M. Lactosuero como fuente de péptidos bioactivos. *Anales venezolanos de Nutrición* 23: 45-50. 2010.
- AGYEI D., DANQUAH M.K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. *Biotechnology Advances* 29: 272-277. 2011.
- AGYEI D., DANQUAH M.K. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology* 23: 62-69. 2012.
- AGYEI D. ONGKUDON C.M., WEI C.Y., CAN A.S., DANQUAH M.K. Bioprocess Challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioproducts processing* 98: 244-256. 2016.
- AOKI W., KURODA K., UEDA M. Next generation of antimicrobial peptides as molecular targeted medicines. *J. Biosci Bioeng* 114: 365-370. 2012.
- ASADUZZAMAN A.K.M., CHUN B.S. Recovery of functional material with thermally antioxidative properties in squid muscle hydrolysates by subcritical water. *J. Food Sci. Technol* 52: 793-802. 2015.
- BUDARIN V.L. SHUTTLEWORTH P.S., DE BRUYN M., FARMER T.J., GRONNOW M.J., PFALTZGRAFF L., MACQUARRIE D.J., CLRAK J.H. The potential of microwave technology for the recovery, synthesis and manufacturing of chemicals from bio-wastes. *Catalysis Today* 239: 80-89. 2015.
- CÍCERO A.F.G., PARINI A., ROSTICCI M. Nutraceuticals and cholesterol-lowering action. *IJC Metabolic & Endocrine* 6: 1-4. 2015.
- CHALAMAIAH M., HEMALATA R., JYOTHIRMAYI T., DIWAN P.V., BHASKARACHARY K., VAJRESWARI A., RAMESH KUMAR R., DINESH KUMAR B. Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from carp (*Cyprinus carpio*) egg. *Nutrition* 31: 388-398. 2015.
- CHAVES-LÓPEZ C, SERIO A., PAPARELLA A., MARTUSECELLI A., CORSETTI M., TOFALO A. Impact of microbial cultures on proteolysis and release of bioactive peptide in fermented mil. *Food Microbiology* 42: 117-121. 2014.
- CHEN J., WANG Y., WU Y., XIA W. Comparison of analytical methods to assay inhibitors of angiotensin I converting enzyme. *Food Chemistry* 141: 3329-3324. 2013.
- CARRASCO-CASTILLA J., HERNÁNDEZ ÁLVAREZ A.J., JIMÉNEZ-MARTÍNEZ C., GUTIÉRREZ-LÓPEZ G.F., DÁVILA-ORTIZ G. Use of Proteomics and Peptidomics Methods in Food Bioactive Peptide Science and Engineering. *Food Eng Rev* 4: 224-243. 2012.
- DE CASTRO R.J.S., SATO H.H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International* 74: 185-198. 2015.
- DE CASTRO R.J.S., SATO H.H. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. *Food Research International* 74: 185-198. 2015.
- DE GOBBA C., ESPEJO-CARPIO F.J., SKIBSTED L.H., OTTE J. Antioxidant peptides from goat milk protein fractions hydrolyzed by two commercial proteases. *International Dairy Journal* 39: 28-40. 2014.
- DE LA HOZ A., DÍAZ ORTIZ A., MORENO A. Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews* 34: 164-178. 2005.
- DOYEN A., BEAULIEU L., SAUCIER L., POULIOT Y., BAZINET L. Demonstration of in vitro anticancer properties of peptide fractions from a snow crab by-products hydrolysate after separation by electro dialysis with ultrafiltration membranes. *Separation and purification*

- technology*: 78: 321-329. 2011.
- EBNER J., ARSLA A.A., FEDOROVA M., HOFFMANN R., KÜÇÜKÇETİN A., PISCHETSRIEDER M. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of proteomics* 117: 41-47. 2015.
- EPEJO CARPIO F.J., DE GOBBA C., GUADIX A., GUADIX E.M., OTTE J. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of enzymatic hydrolysates of goat milk protein fractions. *International Dairy Journal* 32: 175-183. 2013.
- HAMME, V. SANNIER, F., PIOT J.M., DIDELOT S., BORDENAVE-JUCHERAU. Crude goat whey fermentation by *Kluyveromyces marxianus* and *Lactobacillus rhamnosus*: contribution to proteolysis and ACE inhibitory activity. *J. Dairy Res.* 76: 152-157. 2009.
- HASLER M. CLARE. Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges- A Position Paper from the American Council on Science and Health. *J. Nutr.* 132: 3772-3781. 2002.
- HASLER C. M., BROWN A.C. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J. American Dietetic Association* 139: 735-746. 2009.
- HUANG C.Y., WU C.H., YANG J.I., LI Y.H., KUO J.M. Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes. *Taiwan. Journal of Food and Drug analysis.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.06.009> 1021-9498/Copyright. 2015.
- HUNG NGO D., SANG VO T., NGHIEP NGO D., WIJESEKARA I., KWON KIM S. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organism. *International Journal of Biological Macromolecules* 51: 378-383. 2012
- IZQUIERDO F.J., ALLI I., YAYLAYAN V., GOMMEZ R. Microwave-assisted digestion of β -lactoglobulin by pronase α -chymotrypsin and pepsin. *International Dairy Journal* 17: 465-470. 2007.
- JIN D. LIU X., ZHENG X., WANG X., HE J. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry* 204: 427-436. 2016.
- KADAM S.U., TIWARI, B.B.K. ÁLVAREZ C., O'DONNELL C.P. Ultrasound application for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology* 46: 60-67. 2015.
- KIM H.K., CHUN D.S., KIM J.S. Expression of the cationic antimicrobial peptide lactoferricin fused with the anionic peptide in *Escherichia coli*. *App Gen Mol Biotechnol* 72: 330-338. 2006.
- KIM S. K., WIJESEKARA I. Development and biological activities of marine –derived bioactive peptides: A Review. *Journal of functional Foods* 2: 1-9. 2010.
- KLEEKAYI T., HARNEY P.A., O'KEFFE M.B., POYARKOV A.A., CUNHANVES A., SUNTORNSUK W., FITZGERALD R.J. Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. *Food Chemistry* 176: 441-447. 2015.
- KORHONEN H., PIHLANTO A. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16: 945-960. 2006.
- LAFARGA T., ALUKO R.E., RAI D.K., O'CONNOR P., HAYES M. Identification of bioactive peptides from papain hydrolysates of bovine serum albumin and assessment of an antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International* 81: 91-99. 2016.
- LEE Y.S., PHANG L.Y., AHMAD S.A., OOI P.T. Microwave-Alkali Treatment of Chicken Feathers for Protein Hydrolysate Production. *Waste Biomass Valor.* 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-016-9483-7>. 2016.
- LI-CHAN E.C. Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as Nutraceuticals and functional properties and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science* 1: 28-37. 2015.
- MASON T.J., LORIMER J.P. Applied sonochemistry. They uses of power ultrasound in chemistry and processing. Wiley.VCH GmbH &Co. KCGaA 2002.
- MOHANTY D.P., MOHAPATRA S., MISRA S., SAHU P.S. Milk derived peptides and their impact on human health- A review. *Saudi Journal of Biological Sciences.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.005>. 2015
- MÖLLER N.P., SCHOLZ-AHRENS K.E., ROOS, SCHREZENMEIR J. Bioactive peptides and proteins from foods; indication for health effects. *Eur J Nutr* 47: 171-182. 2008.
- MUHAMMAD S.A., AHMED S. Production and characterization of a new antibacterial peptide obtained from *Aeribacillus pallidus* SAT4. *Biotechnology Reports* 8: 72-80. 2015.
- MULERO CÁNOVAS J., ZAFRILLA RENTERO P., MARTÍNEZ CACHÁ A., LEAL HERNÁNDEZ M., ABELLÁN ALEMÁN J. Péptidos bioactivos. *Clin Invest Arterioscl* 23: 219-227. 2011.
- O'DONNELL C.P., TIWARI B.K., BOURKE P., CULLEN P.J. Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science & Technology* 21: 358-367. 2010.
- OZUNA C., PANIAGUA MARTÍNEZ I., CASTAÑO TOSTADO E., OZIMEK L., AMAYA LLLANO S.L. Innovative applications of high-intensity ultrasound in the development of functional food ingredients: Production of protein hydrolysates and bioactive peptides. *Food Research International* 77: 685-696. 2015.
- PEDROCHE J., YUST M.M., LQARI H., MEGIAS C., GIRÓN-CALLE J., ALAIZ M., VIOQUE J., MILLÁN F. Obtaining of *Brassica carinata* protein hydrolysates enriched inn bioactive peptides using immobilized digestive proteases. *Food Research International* 40: 931-938. 2007.
- REDDY P.M. HUANG Y.S., CHEN C.T., CHANG P.C., HO Y.P. Evaluating the potential non-thermal microwave effects of microwave-assisted proteolytic reactions. *Journal of Proteomics* 80: 160-170. 2013.
- RENYE J.R., SMKUTI G.A. Cloning of milk-derived bioactive peptides inn *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol Lett* 30: 723-730. 2007.
- ROGALINSKI T., HERRMANN S., BRUNNER G. 2005. Production of amino acids from bovine serum albumin by

- continuous sub-critical water hydrolysis. *J. of Supercritical Fluids* 36: 49-58.
- RUAN G., CHEN Z., WEI M., LIU Y., LI H., DU F. The study on microwave assisted enzymatic digestion of ginkgo protein. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 94: 23-28. 2013.
- PICKERING T.G., OGEDEGBE G. Capítulo 68. *Epidemiology of Hypertension*. In: Fuster V, Walsh RA, Harrington RA. eds. *Hurst's The Heart, 13e*. New York, NY: McGraw-Hill; 2011. <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=376&Sectionid=40279800>. Accessed January 26, 2016.
- SABBIONE A.C., SCILINGO A., AÑÓN M.C. Potential antithrombotic activity detected in amaranth proteins and its hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology* 60: 171-177. 2015.
- SAADI S., SAARI N., ANWAR F., ABDUL-HAAMID A., MOHD-GHAZALI H. Recent advances in food Biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. 2015. *Biotechnology Advances* 33: 80-116. 2015.
- SADUZZAMAN, A.K.M., CHUN, B.S. Recovery of functional materials with thermally stable antioxidative properties in squid muscle hydrolyzates by subcritical water. *J. Food Sci. Technol* 52:793-802. 2015.
- SALEHI-ABARGOUEI A., ZAHRA M., FATEMEH S., LEILA A. Effects of Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH)-style diet on fatal or non-fatal cardiovascular disease-Incidence: A systematic review and meta-analysis on observational prospective studies. *Nutrition* 29: 611-618. 2013.
- SAMARANYAKA A.G.P., LI-CHAN E.C.Y. Food derived peptidic antioxidant: A review of their production assessment and potential applications. *Journal of Functional Foods* 3: 229-254. 2011.
- SENPHAN T., BENJAKUL S. Antioxidative activities of hydrolysates from sea bass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Journal of Functional Foods* 6: 147-156. 2014.
- SRINIVAS S., PRAKASH V. Bioactive Peptides from Bovine Milk α -Casein: Isolation, Characterization and Multifunctional properties. *Int J Pept Ther* 16: 7-15. 2010.
- TEJESVI M.V., SEGURA D.R., SCHNORR K.M., SANDVANG D., MATTILA S., OLSEN P.B., NEVE S., KRUSE T., KRISTENSEN H.H., PIRTTILÄ. An antimicrobial peptide from entophytic *Fusarium tricinctum* of *Rhododendron tomentosum* Harmaja. *Fungal Diversity* 63: 153-159. 2013.
- TOLDRÁ M., PARÉS D., SAGUER E., CARRETERO C. Hemoglobin hydrolysates from porcine blood obtained through enzymatic hydrolysis assisted by high hydrostatic pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12: 435-442. 2011.
- ULUKO H., ZHANG S., LIU L., TSAKAMA M., LU J., LU J. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods* 18: 1138-1146. 2015.
- WANG Y., CHEN H., WANG J., XING L. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate-chitosan beads. *Process Biochemistry* 49: 1682-1690. 2014.
- YANG B., YANG H., LI J., LI Z., JIANG Y. 2011. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry* 124: 551- 555. 2011
- ZOU Y., DING Y., FENG W., WANG W., LI Q., CHEN Y., WU H., WANG X., YANG L., WU X. Enzymolysis kinetics, thermodynamics and model of porcine cerebral protein with single-frequency countercurrent and pulsed ultrasound assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry* 28: 294-301. 2016.

Producción de Enzimas de *Trichoderma harzianum* por Fermentación de Residuos Lignocelulósicos

Production of *Trichoderma harzianum* Enzymes by Fermentation of Lignocellulosic Residues

Gómez-García, R.¹, Roussos, S.³, Medina-Morales, M. A.¹, Farruggia, B.², Pico, G.² and Aguilar, C. N.^{1*}

¹Grupo de Investigación en Bioprocesos y Bioproductos. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.

²Institut Méditerranéen d'Écologie et de Paléocécologie (IMEP, UMR CNRS/IRD 6116), Laboratoire d'Ecologie Microbienne et Biotechnologies, FST St Jerome, Université Paul Cézanne, 13397

Marseille Cedex 20, France

³Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos (IPROBYQ-CONICET), National University of Rosario Argentina

*Autor para correspondencia: crisobal.aguilar@uadec.edu.mx +52 1 844 416 12 38

Resumen

El uso de residuos agroindustriales como sustratos sólidos para el crecimiento fúngico en el bioproceso llamado Fermentación en Medio Sólido (FMS) juega un papel importante en diversas áreas como el medio ambiente y la alimentación. Esta importancia se ha incrementado en las últimas décadas en el ámbito de la investigación referente a la bioconversión y valorización de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. El género *Trichoderma* contiene especies que son de gran importancia biotecnológica. Algunas de ellas son usadas como agentes de biocontrol contra enfermedades de plantas, otras en la biorremediación de ambientes contaminados, además se ha aplicado en procesos de FMS para la bioconversión de residuos agroindustriales para la producción de biomoléculas con alto valor como; enzimas lignocelulolíticas, entre otros bioproductos. Actualmente, las enzimas fúngicas presentan diferentes ventajas contra las enzimas de origen animal y vegetal relacionadas con altos títulos de producción y alta estabilidad, mayor actividad catalítica y mayor afinidad al sustrato. En este trabajo se analizan y discuten los avances y los retos de la bioconversión de la materia lignocelulósica a través de la aplicación del hongo *Trichoderma harzianum* por su capacidad de producción de enzimas así como su potencial aplicación en industrias alimentarias, textiles y biorefinerías.

Palabras clave: Bioconversión, enzimas, residuo lignocelulósico, *Trichoderma*

Abstract

The use of agroindustrial residues as solid substrates for fungal growth in the bioprocess called Solid-State Fermentation (SSF) plays an important role in various areas such as the environment, food, feed and industrial sectors. This importance has increased in recent decades in the research field concerning the bioconversion and valorization of lignocellulosic agro-industrial by-products. The genus *Trichoderma* contains species that are of great importance biotechnology; some of them are used as biocontrol agents against plant diseases, as bioremediation of contaminated environments, also in recent years has increased their application in SSF process for bioconversion of residual material in order to produce value-added biomolecules such as: lignocellulolytic enzymes, among other bioproducts. Currently, fungi enzymes present different advantages against animal and plant origin enzymes related with high values of production and high stability, major catalytic activity and substrate affinity. This review analyzes and discusses the progress and challenges of the bioconversion of lignocellulosic material with the fungus *Trichoderma harzianum* due its high capacity to produce lignocellulosic enzymes as well as their potential application in food, textile and biorefinery industries.

Keywords: Bioconversion, enzymes, lignocellulosic material, *Trichoderma*

INTRODUCCIÓN

Los desechos lignocelulósicos incluyen residuos de la industria forestal y de la agronomía, dichos residuos son las más prometedoras alternativas de fuentes de energía y puede ser utilizados como material de bajo costo para la obtención de productos con alto valor comercial e industrial¹. Estos materiales lignocelulósicos están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, son abundantemente disponibles además de ser materiales renovables encontrados en la naturaleza². Con el incremento de la demanda energética y la preocupación sobre la contaminación continua del medio ambiente, el desarrollo de metodologías o procesos que ayuden a la obtención de fuentes de energías alternativas y disminuyan la contaminación ambiental ha sido objeto de estudio en la última década³. La bioconversión de biomasa lignocelulósica promete ser un proceso adecuado capaz de contrarrestar los problemas energéticos y de contaminación presente en la actualidad, esto debido a su gran disponibilidad y su poco o nulo costo de adquisición, además durante el proceso no hay emisiones nocivas a la salud humana y es amigable con el medio ambiente. Por otro lado, dicho proceso puede ser aprovechado para la obtención y producción de moléculas con alto peso molecular de gran valor comercial, la bioconversión de materia lignocelulósica y la producción de biomoléculas se ha llevado a cabo mediante fermentación acoplada en cultivo continuo⁴. La FMS es una técnica biotecnológica simple para el cultivo microbiano y la producción de metabolitos. Tiene la ventaja de no requerir equipos complejos, lo que da como resultado menores costos de producción^{5,6,7}. La FMS ha sido definida por diferentes autores como un proceso microbiano o cultivo que se desarrolla no sólo en la superficie sino también dentro de una matriz porosa sólida y en ausencia de líquido libre^{8,9}. La matriz porosa puede estar constituida del sustrato húmedo o un soporte inerte capaz de absorber los nutrientes que se disuelven en la solución¹⁰. Dependiendo de la naturaleza de la fase sólida, hay dos tipos de fermentación: a) Medio de cultivo impregnado sobre un soporte inerte y b) Cultivo en una fase sólida sustrato/soporte. Los bioprocesos microbianos en residuos orgánicos han demostrado ser una herramienta potencial para la reducción de contaminación en el medio ambiente y en la obtención de productos con valor agregado. En la actualidad se conocen varios grupos de microorganismos los cuales son utilizados en la biotransformación de los residuos a nuevos productos. *Aspergillus spp* es conocida por producir ácidos orgánicos tales como ácidos cítrico y láctico a partir de cascaras cítricas, *Bacillus sp* esta cepa es utilizada para la producción de enzimas como celulasas, amilasas y proteasas^{11,12} y *T. harzianum* se ha reportado su aplicación para la producción de metabolitos secundarios como aromas y en la producción de enzimas lignocelulolíticas.

DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Trichoderma*

El género *Trichoderma* se ubica taxonómicamente dentro del reino fungí, división Mycota, subdivisión Eumycota, clase Deuteromycetes, orden Moniales, familia Moniliacea, género *Trichoderma*. Morfológicamente, es un hongo que posee conidias hialinas uniceluladas. Los conidios son erectos, hialinos en su mayoría ramificada, no verticilada los que pueden ser solitarios o en grupo¹³. Las fialidades en forma de botella hinchadas de la región central pero delgadas hacia el ápice, son hialinas y en ángulos rectos hacia los conidióforos, tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, estructuras de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas¹⁴. *Trichoderma* es un hongo aerobio, facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos de todas las zonas climáticas del mundo (suelos agrícolas, pastizales, bosques, desiertos y ecosistemas acuáticos)¹⁵, también se ha encontrado sobre la superficie de la raíces de las plantas y sobre cortezas en descomposición. Algunas especies de *Trichoderma* son ampliamente utilizadas como agentes de control biológico, en la agricultura contra varios hongos fitopatógenos y nematodos, otras para la producción de enzimas con interés industrial como celulasas, pectinasas, quitinasas, proteasas, xilanasas^{16,17,18}.

CARACTERÍSTICAS COMUNES *T. harzianum*

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, que son capaces de degradar para aprovecharlo como sustrato y potenciar su desarrollo. Hay una peculiaridad del género *Trichoderma* la cual es su crecimiento y esporulación rápida en la oscuridad. Son hongos mesófilos tolerantes a baja temperatura (10 °C), pero el micelio es muy sensible a temperaturas superiores a 30 °C. Algunos microorganismos han sido reportados como xilanolíticos, la mayoría de las bacterias, hongos y levaduras que producen dicha enzima lo hacen extracelularmente. La capacidad de diferentes variedades de *Trichoderma spp.* de producir xilanasas, ha sido reportada, así como su aplicación en la industria alimentaria, textil, biorefinería y otras¹⁴. El uso de la xilanasas para la hidrólisis de material lignocelulósico está bajo estudio extenso debido a la producción de xilosa, el cual puede ser usado como materia prima de fermentación en la producción de ácido xilónico, xilitol y bioetanol¹⁹. También existe interés en el uso de xilanasas en el bioblanqueo de pastas de celulosa, lo que disminuye la demanda de átomos de cloro en el blanqueo convencional en la fabricación de papel²⁰. Entre las especies de *Trichoderma* más ampliamente empleados destacan *Trichoderma reesei*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma sperellum* y *Trichoderma harzianum*. Este

género se le puede encontrar en diferentes materiales orgánicos y suelos, están adaptados a diferentes condiciones ambientales lo que facilita su amplia distribución. Algunas especies prefieren ambientes secos y templados. Estos hongos son ampliamente conocidos por su producción de toxinas y antibióticos²¹. En el estadio temprano de *T. harzianum*, el color del micelio es blanco y eventualmente desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación (figura 1). Las colonias de *T. harzianum* crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar papa y dextrosa (PDA) a una temperatura de 25 °C. Las especies de este género generalmente prefieren un pH ácido que oscila entre 4.5 – 5, además se desarrolla en áreas como un exceso contenido de humedad y un estancamiento de bióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera además, *T. harzianum* puede crecer de buena forma sobre aminoácidos, amoníaco, urea y nitrato. Un mejor crecimiento de *T. harzianum* se observa en presencia de azúcares como; *D*-manosa, *D*-galactosa, *D*-xilosa, sacarosa y manitol²². El crecimiento de *Trichoderma* y particularmente *T. harzianum* se caracteriza por cuatro etapas fisiológicas^{10,23}; la conservación, germinación de conidias, multiplicación vegetativa del micelio y conidiogénesis. Las conidiosporas son el medio de conservación del microorganismo a largo plazo, las cuales son empleadas como inóculo de FMS. La germinación de *T. harzianum* en azúcares simples comienza después de 9 horas de cultivo y termina después de 14 horas. Después de este período, todas las conidiosporas presentan un tubo germinativo de longitud variable, pero mayor que el diámetro de la espora. El micelio se desarrolla y presenta muchas ramificaciones. Esta fase conduce a una alta producción de biomasa. La conidiogénesis es una etapa fisiológica muy importante para los hongos. Esta etapa corresponde a una formación y liberación de esporas las cuales son muy resistentes y forman parte de la reproducción asexual de los microorganismos. Se conoce que la liberación de esporas se induce mediante la limitación de nutrientes del medio de cultivo. La naturaleza de este factor es muy variable, el agotamiento de fuente de carbono y nitrógeno es generalmente un factor limitante para la producción de esporas. Además existen otros factores fisicoquímicos que pueden dar paso a la conidiogénesis tales como el pH, concentración de dióxido de carbono, oxígeno, temperatura, humedad y/o la aparición de metabolitos secundarios²⁴.

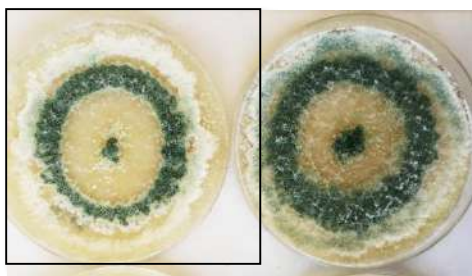


Figura 1. Morfología macroscópica de *T. harzianum* en Papa Dextrosa Agar a 37 °C

ENZIMAS

Xilanasas

Las enzimas xilanasas (EC3.2.1.8) son extensamente distribuidas, se produce tanto en organismos procariotas y eucariotas y se ha encontrado mayormente en eucariotas incluyendo, protozoos, insectos, caracoles y en semillas germinadas de plantas²⁵. Pertenecen al grupo de las enzimas hemicelulolíticas las cuales tienen el poder catalítico para degradar la cadena polimérica de hemicelulosa hidrolizando los enlaces β -1,4-xilanos presentes en la cadena homopolimérica de xilano (figura 2). Este grupo de enzimas juegan un papel importante en la bioconversión de dicho polímero debido a su gran y compleja estructura. Las xilanasas, se definen y clasifican de acuerdo sobre el substrato en el que actúan. Se agrupan colectivamente como glucano hidrolasas. *L*-arabinasas degradan solo *L*-arabino-*D*-galactan, manosas hidrolizan enlaces β -(1,4)-*D*-manopiranososa de manano y β -xilanasas rompen los enlaces β -(1,4)-*D*-xilopiranosil de xilano²⁶. Existen tres diferentes tipos de xilanasas involucradas en la degradación del xilano.

Endo- β -(1,4)-D-Xilanasas [β -(1,4)-*D*-Xilano Hidrolasa, EC 3.2.1.8]

Esta enzima actúa aleatoriamente sobre la cadena de xilano para producir grandes cantidades de xilo-oligosacaridos de cadenas de diferentes tamaños^{23,27,28}.

Hay cuatro tipos:

- Endoxilanasas no Liberadoras de Arabinosa, las cuales no pueden actuar sobre los enlaces iniciales β -(1,4) de *L*-arabinosil en la ramificación y produce solo xilobiosa y xilosa como el producto final mayoritario. Estas enzimas pueden hidrolizar los xilo-oligosacaridos en monómeros de xilobiosa.
- Endoxilanasas no Liberadoras de Arabinosa, estas enzimas no pueden romper la ramificación en los puntos α -(1,2) y α -(1,3) y produce principalmente xilo-oligosacaridos más largos que la xilobiosa. Estas endoxilanasas no tienen mecanismo de acción sobre xilotriosa y xilobiosa.
- Endoxilanasas Liberadoras de Arabinosa. Estas enzimas rompen las cadenas de xilano en los puntos de ramificación y produce principalmente, xilobiosa, xilosa y arabinosa.

Endoxilanas Liberadoras de Arabinosa, estas pueden hidrolizar los puntos de ramificación y producir xilo-oligosacaridos de tamaño intermedio y arabinosa.

Exo- β -(1,4)-D-xilanasas [β -(1,4)-*D*-Xilano Xilohidrolasa]

Estas enzimas hidrolizan los xilo-oligosacaridos liberados por acción de la *Endo- β -(1,4)-D-xilanasas*, desde el extremo no reductor de la cadena dando como producto xilobiosa, algunos autores reportan la inactivación de esta enzima tras la

acumulación de dicho disacárido el cual solo puede ser hidrolizado la enzima β -xilosidasa²⁹.

β -Xilosidasa o Xilobiasa: (EC 3.2.1.37)

Los disacáridos formados son degradados a xilosa por la acción de esta enzima, la cual remueve las unidades de xilosa del extremo no reductor de los xilo-oligosacáridos³⁰. Los grupos laterales restringen la acción de las β -xilosidasas, y por lo tanto sólo los oligosacáridos no sustituidos se degradan totalmente. Se dice que algunas β -xilosidasas actúan también sobre xilano polimérico²⁹.

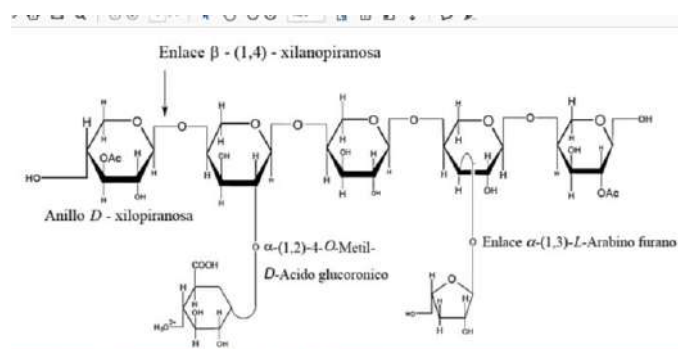


Figura 2. Estructura química del xilano

Celulasas

Las celulasas son una mezcla de tres enzimas hidrolasas, las cuales actúan sobre las cadenas poliméricas de celulosa (figura 3), rompiendo los enlaces β -1,4 glucosídicos presentes en la celulosa³¹. La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza que cubre las dos terceras partes de la biomasa lignocelulósica y puede ser hidrolizada en azúcares como glucosa, hexosas y pentosas para la producción de biocombustibles³². La hidrólisis de este polisacárido se ha llevado a cabo por métodos químicos y físicos, haciendo estos procesos tardados y costos, además de impactar negativamente al medio ambiente³³.

El desarrollo de procesos biotecnológicos para llevar a cabo dicha bioconversión en monómeros simples de glucosa es de suma importancia, en la cual refiere en la producción y el uso de enzimas lignocelulolíticas³⁴.

Para acceder a estas fracciones celulósicas se requiere una hidrólisis sucesiva de tres enzimas³⁵:

1. Endo- β -1,4 glucanasa = Carboximetil celulosa (ACMC) o No. 3.2.1.4 (EG: Cx)
2. Exo- β -1,4 glucanasa = Celobiohidrolasa o No. 3.2.1.91 (CBH: C1)
3. β -glucosidasa o Celobiasa No. 3.2.1.21

La definición más simple de celulasa consiste en un complejo polienzimático que atacan la celulosa y la transforme en sacarosas simples capaces de atravesar la pared celular³⁶. De acuerdo con esta definición, el sistema enzimático completa sólo existe en relativamente pocos microorganismos; el más conocido entre los hongos filamentosos son *Aspergillus*, *Chaetomium* y *Trichoderma*³⁷. El mecanismo de acción de este complejo se efectúa con la hidrólisis primaria de la celulosa microcristalina creando rupturas en las cadenas del polímero llevada a cabo por la Endo- β -1,4 glucanasa, seguida por la acción de Exo- β -1,4 glucanasa la cual ataca los puntos de ruptura desde los extremos de la celulosa produciendo tetrasacáridos o disacáridos como la celobiosa³⁸. La acción continúa y combinada de la de ambas enzimas permiten la conversión completa de la celulosa en celobiosa y pequeños oligosacáridos. Finalmente, la enzima β -glucosidasa actúa sobre la celobiosa y oligosacáridos para liberar el monómero de glucosa²³.

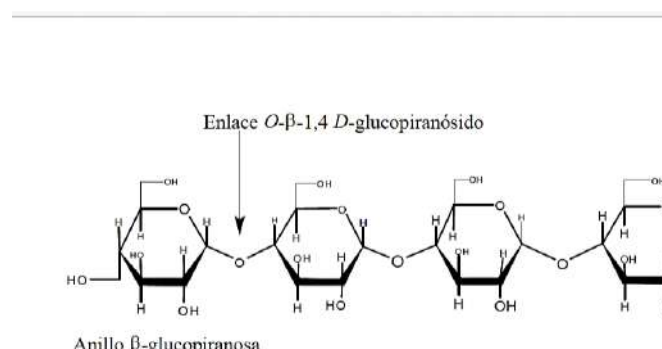


Figura 3. Estructura química del polímero de celulosa

RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Diversos investigadores de todo el mundo han reportado el aprovechamiento de material vegetal de industrias principalmente alimentarias, las cuales deshecha toneladas de este material el cual es considerado un residuo sin valor alguno y sin alguna aplicación relevante. En un estudio reciente fue reportado el aprovechamiento de material residual proveniente de frutas y verduras para la producción de ácidos orgánicos y enzimas lignocelulolíticas³⁹. Adicionalmente, en el cuadro 1 se muestran una recopilación de datos en la aplicación de materiales residuales más empleados, así como los principales productos obtenidos por FMS. Estas evidencias científicas demuestran la aplicabilidad de esta materia prima como fuente natural para la obtención de bioproductos con alto valor e importancia industrial.

Tabla 1. Aplicaciones de residuos lignocelulósicos para la obtención de productos con alto valor agregado por fermentación.

| Productos | Microorganismos | Referencias |
|-------------|---------------------------------|--------------------------------|
| Celulasas | <i>T. harzianum</i> | Srivastava y col. ² |
| Celulasas | <i>Aspergillus niger</i> | Pirota y col. ⁴⁰ |
| Celulasas | <i>T. asperellum</i> | Nava y col. ⁴¹ |
| Polifenoles | <i>A. niger</i> | Martínez y col. ⁴² |
| Etanol | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Heredia y col. ⁴³ |
| Celulasas | <i>A. niger</i> | Robledo y col. ⁶ |
| Quitinasas | <i>T. harzianum</i> | Zhang y col. ²² |

Trichoderma harzianum desarrolla un papel fundamental en el aprovechamiento de material lignocelulósico residual debido a la gran facilidad con la que crece sobre el material, asimilando como fuente de carbono los componentes estructurales presentes, principalmente celulosa y hemicelulosa. La bioconversión por fuentes microbianas de estos compuestos presentes en la naturaleza ha sido el tema principal de investigación en diversos grupos del mundo ya que la obtención de estos materiales lignocelulósicos no representa problema alguno además su costo es muy bajo o casi nulo y con el aprovechamiento de este tipo de material para el crecimiento microbiano y con la ayuda de metodologías fermentativas es posible la producción de moléculas con gran valor industrial, haciendo este proceso de muy alta rentabilidad, disminuyendo los tiempos de producción y el costo del mismo. Debido a la complejidad de la estructura hetero-polimérica de la celulosa y el reto que representa su degradación en moléculas monoméricas, se han desarrollado metodologías en la búsqueda de enzimas con capacidad de hidrolizar este polímero, tal es el caso de las celulasas y xilanasas microbianas. Las aplicaciones de estas enzimas específicas con mayor potencial estarán en las industrias de papel, pulpa y agrícola industria alimentaria y en la producción de biocombustibles. Los avances en la biotecnología microbiana en las últimas décadas han construido una vía exitosa para la aplicación y valorización de residuos lignocelulósicos en la producción de enzimas más específicas y con mayor estabilidad.

PRODUCCION DE ENZIMAS LIGNOCELULITICAS POR *T. harzianum*

En los últimos años, una creciente preocupación ha surgido debido al gran impacto negativo sobre el medio ambiente que es provocado por los residuos lignocelulósicos ya que actualmente dichos residuos no cuentan con alguna aplicación relevante tan solo empleados para alimentación animal y/o

son acumulados o descartados en depósitos sanitarios. Por tal carencia en el uso o empleo de estos materiales orgánicos, un gran número de científicos en las áreas de ingeniería de alimentos y biotecnología han estado en constante investigación, mejorando y optimizando las condiciones de crecimiento y desarrollo del hongo *Trichoderma* en el proceso de FMS⁴⁴, enfocándose en la valorización y el aprovechamiento de este material vegetal eliminando o disminuyendo los problemas asociados con la contaminación y principalmente para la aplicación en la producción de enzimas fúngicas con alto valor industrial (Tabla 2). En un estudio llevado a cabo por Jun y col.⁴⁵ demostró la capacidad del hongo *T. reesei* de crecer en medio solido y producir 5.35 Unidades Internacionales (UI) por miligramo proteína de xilanasas así como 4.33 Unidades carboximetil celulosa (CMC) y 0.49 Unidades de Papel Filtro (UPF) por miligramo de proteína correspondientes a la actividad celulasa. Además, Delabona y col.¹⁵ demostraron la aplicación de los residuos de bagazo de caña de azúcar para la producción de enzimas por *T. harzianum* en cultivo solido obteniendo títulos de 121 UPF, 8000 UI y 1730 UI por gramo de soporte de celulasa, xilanasas y β -glucosidasa, respectivamente. Adicionalmente, en un estudio enfocado en el aprovechamiento de residuos lignocelulósicos llevado a cabo por Gómez-García y col.⁴⁶ emplearon olote de maíz como única fuente de carbón para *T. harzianum* para la producción de xilanasas alcanzando niveles de actividad xilanólítica de 7.85 UI por gramo de soporte. Actualmente, existen diversos trabajos de investigación con respecto al uso de *T. harzianum*, sin embargo, muchos de ellos aún son realizados utilizando diferentes metodologías para la obtención de enzimas, tal es el caso de Li y col.⁴⁷, ellos utilizaron la fermentación en medio liquido (FML) empleando rastrojo de maíz como substrato para la producción de celulasa microbiana (7.18 CMC, 0.64 UPF y 2.91 UI por mL) y Wang y col.⁴⁸ también emplearon la FML combinando diferentes fuentes de carbono al medio de cultivo como aceite de palma, olote de maíz y salvado de trigo para la producción de enzimas de *T. harzianum* permitiendo la producción enzimática de xilanasas (185.4 UI/ mL), β -xilosidasa (5.59 UI/ mL), celulasa (72.66 CMC y 14.79 UPF/ mL) y β -glucosidasa (20.78 UI/ mL). Estas evidencias refuerzan el valor y el potencial de emplear a *T. harzianum* para la producción de enzimas con gran actividad biológica y además junto con la escasa información reportada involucrando la aplicación de FMS, dejan un amplio camino para la generación de futuros estudios de investigación, en los cuales se desarrollen y se optimicen mejor las condiciones de producción para obtener mayores títulos de actividad enzimática (menores tiempos y costos implementación) así como también permita el desenvolvimiento de nuevas estrategias innovadoras dirigidas a la implementación de dichas metodologías a un nivel industrial la cual permita utilizar la mayor cantidad de residuos evitando los problemas ambientales de contaminación.

Tabla 2. Espectro actual de estudios con respecto a la aplicación biotecnológica de *Trichoderma* para la producción de enzimas lignocelulósicas.

| Hongo | Substrato | Enzima | Actividad enzimática | Referencias |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>T. harzianum</i> | Rastrojo de maíz | Celulasa | 7.18 CMC/ mL 0.64 UFP/ mL 2.91 UI/ mL | Li y col. ⁴⁷ |
| <i>T. harzianum</i> | Aceite de palma Olate de maíz Salvado de trigo | Celulasa β -glucosidasa Xilanasa β -xilosidasa | 72.66 CMC/ mL 14.79 UPF/ mL 20.78 UI/ mL 185.4 UI/ mL 5.59 UI/ mL | Wang y col. ⁴⁸ |
| <i>T. harzianum</i> | Olate de maíz | Xilanasa | 7.85 UI/ g soporte | Gómez-García y col. ⁴⁶ |
| <i>T. harzianum</i> | Soja | Celulasa | 8.18 UI/ mg | Zhang y col. ²² |
| <i>T. reesie</i> | Vainas de <i>Prosopis juliflora</i> | Celulasa Xilanasa | 3055.65 UI/ L 422.16 UI/ L | Jampala y col. ⁴⁹ |
| <i>T. reesie</i> | Paja de arroz | Xilanasa Celulasa | 1500 UI/ mL 300 CMC/ mL | Kogo y col. ⁵⁰ |
| <i>T. reesie</i> | Rastrojo de maíz y para de arroz | Xilanasa Celulasa | 300 UI/ g soporte 20 UPF/ g soporte 10 CMC/ g soporte | Fang y Xia, ³⁵ |
| <i>T. inhamatum</i> | Salvado de trigo | Xilanasa | 652.1 UI/ mg proteína | Silva y col. ⁵¹ |
| <i>T. asperellum</i> | Paja de trigo y arroz, salvado de trigo, olate y rastrojo de maíz y bagazo de caña de azúcar | Celulasa β -glucosidasa | 10.25 CMC/ g soporte 1.6 UPF/ g soporte 6.13 UI/ g soporte | Raghuwanshi y col. ⁵² |
| <i>T. reesie</i> | Medio de cultivo 2% Avicel | Xilanasa β -glucosidasa | 891 UI/ mg proteína 14.6 UI/ mg proteína | Liu y Yu, ⁵³ |
| <i>T. harzianum</i> | Bagazo de caña | Xilanasa Celulasa β -glucosidasa | 8000 UI/ g soporte 121 UPF/ g soporte 1730 UI/ g soporte | Delabona y col. ¹⁵ |
| <i>T. reesie</i> | Composta | Xilanasa Celulasa Celulasa | 5.35 UI/ mg proteína 4.33 UPF/ mg proteína 0.49 CMC/ mg proteína | Jun y col. ⁴⁵ |

UI: unidades internacionales; CMC: unidades carboximetil celulosa; UFP; unidades papel filtro

CONCLUSIONES

Un enfoque para reducir el costo de producción de enzimas fúngicas es el uso de materiales lignocelulósicos como sustratos en lugar de celulosa pura. Hoy en día, existen estudios en los cuales está bien reportado y justificado el uso de material residual perteneciente a la agroindustria, como el rastrojo de maíz, paja de trigo, paja de arroz, bagazo y olate de maíz. La demanda de producción de estas enzimas se ha incrementado significativamente entre los diferentes cuerpos de investigación alrededor del mundo, esto debido a la gran gama de aplicaciones en diferentes áreas de la industria. La descomposición biológica de la celulosa en elementos simples permitirá la mejora de los graves problemas a mediano plazo, como los alimentos, la energía y la contaminación ambiental.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo del Programa de Fortalecimiento de la Cooperación Científica, Tecnológica y de Innovación en un Marco de Cooperación Internacional del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (C0013-2015-03-G1: 266614).

REFERENCIAS

- (1) Venkateswar Rao, L.; Goli, J. K.; Gentela, J.; Koti, S. Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to Xylitol: An Overview. *Bioresour. Technol.* **2016**, *213*, 299–310. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>.
- (2) Srivastava, N.; Singh, J.; Ramteke, P. W.; Mishra, P. K.;

- Srivastava, M. Improved Production of Reducing Sugars from Rice Straw Using Crude Cellulase Activated with Fe₃O₄/Alginate Nanocomposite. *Bioresour. Technol.* **2015**, *183*, 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.059>.
- (3) Ren, N. Q.; Zhao, L.; Chen, C.; Guo, W. Q.; Cao, G. L. A Review on Bioconversion of Lignocellulosic Biomass to H₂: Key Challenges and New Insights. *Bioresour. Technol.* **2015**, *215*, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.124>.
- (4) Malisorn, C.; Suntornsuk, W. Improved β -Carotene Production of *Rhodotorula glutinis* in Fermented Radish Brine by Continuous Cultivation. **2009**, *43*, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.08.005>.
- (5) Roadjanakamolson, M.; Suntornsuk, W. Production of β -Carotene-Enriched Rice Bran Using Solid-State Fermentation of *Rhodotorula glutinis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *20* (3), 525–531. <https://doi.org/10.4014/jmb.0809.0550>.
- (6) Robledo Olivo, A.; Noé Aguilar, C.; Montañez Sáenz, J. C. Uso Del Olote de Maíz Como Sustrato Microbiano Para La Obtención de Xilanasas. *Rev. Científica la Univ. Auton.* **2012**, *4* (7), 6.
- (7) Ang, S. K.; Shaza, E. M.; Adibah, Y. A.; Suraini, A. A.; Madihah, M. S. Production of Cellulases and Xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 Using Untreated Oil Palm Trunk through Solid State Fermentation. *Process Biochem.* **2013**, *48* (9), 1293–1302. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.019>.
- (8) Saucedo-Castaneda, G.; Gutierrez-Rojas, M.; Bacquet, G.; Raimbault, M.; Viniegra-Gonzalez, G. Heat Transfer Simulation in Solid Substrate Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, *35* (8), 802–808. <https://doi.org/10.1002/bit.260350808>.
- (9) Viniegra-González, G.; Favela-Torres, E.; Aguilar, C. N.; Romero-Gomez, S. de J.; Díaz-Godínez, G.; Augur, C. Advantages of Fungal Enzyme Production in Solid State over Liquid Fermentation Systems. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *13* (2–3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6).
- (10) Oriol, E.; Raimbault, M.; Roussos, S.; Viniegra-gonzales, G. Water and Water Activity in the Solid State Fermentation of Cassava Starch by *Aspergillus niger*. *Appl Microbiol Biotech* **1988**, *27*, 498–503.
- (11) Orzua, M. C.; Mussatto, S. I.; Contreras-Esquivel, J. C.; Rodriguez, R.; de la Garza, H.; Teixeira, J. A.; Aguilar, C. N. Exploitation of Agro Industrial Wastes as Immobilization Carrier for Solid-State Fermentation. *Ind. Crops Prod.* **2009**, *30* (1), 24–27. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.02.001>.
- (12) Martins, S.; Mussatto, S. I.; Martínez-Avila, G.; Montañez-Saenz, J.; Aguilar, C. N.; Teixeira, J. A. Bioactive Phenolic Compounds: Production and Extraction by Solid-State Fermentation. A Review. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29* (3), 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.008>.
- (13) Villegas, S. J. EVALUACIÓN DE *Trichoderma Asperellum* COMO BIORREGULADOR DE *Spongopora subterranea* f. Sp. *Subterranea EVALUATION OF Trichoderma Asperellum AS BIORREGULATOR OF Spongopora subterranea* f. Sp. *Subterranea. Rev. Fac. Nac. Agron.* **2008**, *61* (2), 4496–4502.
- (14) Almeida, E.; Mendes, L.; Paula, A.; Uetanabaro, T.; Galvão, E.; Brito, L.; Priminho, C.; Miura, A. Thermoresistant Xylanases from *Trichoderma stromaticum*: Application in Bread Making and Manufacturing Xylo-Oligosaccharides. *Food Chem.* **2017**, *221*, 1499–1506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.144>.
- (15) Delabona, P. da S.; Farinas, C. S.; da Silva, M. R.; Azzoni, S. F.; Pradella, J. G. da C. Use of a New *Trichoderma harzianum* Strain Isolated from the Amazon Rainforest with Pretreated Sugar Cane Bagasse for On-Site Cellulase Production. *Bioresour. Technol.* **2012**, *107*, 517–521. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.048>.
- (16) Martínez, B. I.; I, D. I.; Ii, Y. R. *Trichoderma* Spp. y Su Función En El Control de Plagas En Los Cultivos. *Rev. Protección Veg.* **2013**, *28* (1), 1–11.
- (17) Markovich, N. a; Kononova, G. L. Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Protecting Plants from Fungal Diseases. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **2015**, *39* (4), 389–400.
- (18) Xue, A. G.; Guo, W.; Chen, Y.; Siddiqui, I.; Marchand, G.; Liu, J.; Ren, C. Effect of Seed Treatment with Novel Strains of *Trichoderma* Spp. on Establishment and Yield of Spring Wheat. *Crop Prot.* **2017**, *96*, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.02.003>.
- (19) Sabu, A.; Kiran, G. S.; Pandey, A. Purification and Characterization of Tannin Acyl Hydrolase from *Aspergillus niger* ATCC 16620. *Food Technol. Biotechnol.* **2005**, *43* (2), 133–138. <https://doi.org/10.1002/jobm.200310273>.
- (20) Yasinok, A. E.; Biran, S.; Kocabas, A.; Bakir, U. Xylanase from a Soil Isolate, *Bacillus pumilus*: Gene Isolation, Enzyme Production, Purification, Characterization and One-Step Separation by Aqueous-Two-Phase System. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26* (9), 1641–1652. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0340-8>.
- (21) Singh, V.; Sanmukh, R.; Kumar, B.; Bahadur, H. *Trichoderma asperellum* Spore Dose Depended Modulation of Plant Growth in Vegetable Crops. *Microbiol. Res.* **2016**, *193*, 74–86. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.09.002>.
- (22) Zhang, F.; Chen, C.; Zhang, F.; Gao, L.; Liu, J.; Chen, L.; Fan, X.; Liu, C.; Zhang, K.; He, Y.; et al. *Trichoderma harzianum* Containing 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase and Chitinase Improved Growth and Diminished Adverse Effect Caused by *Fusarium oxysporum* in Soybean. *J. Plant Physiol.* **2017**, *210*, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.10.012>.
- (23) Kunamneni, A.; Plou, F. J.; Alcalde, M. *Trichoderma Enzymes for Food Industries*; Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00024-2>.

- (24) Kong, P.; Hong, C. Biocontrol of Boxwood Blight by *Trichoderma Koningiopsis* Mb2. *Crop Prot.* **2017**, *98*, 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.03.015>.
- (25) Dekker, R. F. H. Biodegradation of the Hemicelluloses. *Biosynth. Biodegrad. wood components* **1985**, No. January 1985, 505–533. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-347880-1.50022-2>.
- (26) Kolenová, K.; Vršanská, M.; Biely, P. Purification and Characterization of Two Minor Endo- β -1,4-Xylanases of *Schizophyllum Commune*. *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *36* (7), 903–910. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.01.006>.
- (27) Bastawde, K. B. Xylan Structure, Microbial Xylanases, and Their Mode of Action. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1960**, *8*, 353–368. <https://doi.org/10.1007/BF01198746>.
- (28) Kolenová, K.; Vršanská, M.; Biely, P. Mode of Action of Endo- β -1,4-Xylanases of Families 10 and 11 on Acidic Xylooligosaccharides. *J. Biotechnol.* **2006**, *121* (3), 338–345. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.001>.
- (29) Ii, X. Y. N.; Iii, X. Y. N.; Iv, X. Y. N. Xylanase XYN IV from *Trichoderma Reesei* Showing Exo- and Endo-Xylanase Activity. **2013**, *280*, 285–301. <https://doi.org/10.1111/febs.12069>.
- (30) Collins, T.; Gerday, C.; Feller, G. Xylanases, Xylanase Families and Extremophilic Xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29* (1), 3–23. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>.
- (31) Xia, L.; Cen, P. Cellulase Production by Solid State Fermentation on Lignocellulosic Waste from the Xylose Industry. *Process Biochem.* **1999**, *34* (9), 909–912. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00015-1).
- (32) Chandra, M. S.; Viswanath, B.; Reddy, B. R. Cellulolytic Enzymes on Lignocellulosic Substrates in Solid State Fermentation by *Aspergillus Niger*. *Indian J. Microbiol.* **2007**, *47* (4), 323–328. <https://doi.org/10.1007/s12088-007-0059-x>.
- (33) Zhang, T.; Li, W.; Xu, Z.; Liu, Q.; Ma, Q.; Jameel, H.; Chang, H. min; Ma, L. Catalytic Conversion of Xylose and Corn Stalk into Furfural over Carbon Solid Acid Catalyst in γ -Valerolactone. *Bioresour. Technol.* **2016**, *209*, 108–114. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.02.108>.
- (34) Kawee-Ai, A.; Srisuwun, A.; Tantiwa, N.; Nontaman, W.; Boonchuay, P.; Kuntiya, A.; Chaiyaso, T.; Seesuriyachan, P. Eco-Friendly Processing in Enzymatic Xylooligosaccharides Production from Corn cob: Influence of Pretreatment with Sonocatalytic-Synergistic Fenton Reaction and Its Antioxidant Potentials. *Ultrason. Sonochem.* **2016**, *31*, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2015.12.018>.
- (35) Fang, H.; Xia, L. Cellulase Production by Recombinant *Trichoderma Reesei* and Its Application in Enzymatic Hydrolysis of Agricultural Residues. *Fuel* **2015**, *143*, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.11.056>.
- (36) Dondelinger, E.; Aubry, N.; Chaabane, F. Ben; Cohen, C.; Tayeb, J.; Rémond, C. Contrasted Enzymatic Cocktails Reveal the Importance of Cellulases and Hemicellulases Activity Ratios for the Hydrolysis of Cellulose in Presence of Xylans. *AMB Express* **2016**. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0196-x>.
- (37) dos Reis, L.; Fontana, R. C.; da Silva Delabona, P.; da Silva Lima, D. J.; Camassola, M.; da Cruz Pradella, J. G.; Dillon, A. J. P. Increased Production of Cellulases and Xylanases by *Penicillium Echinulatum* S1M29 in Batch and Fed-Batch Culture. *Bioresour. Technol.* **2013**, *146*, 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.124>.
- (38) Ray, R. C.; Tuber, I.-C.; Shekhar, S.; Officer, B.; Public, O.; View, B. E. *Solid State Fermentation for Production of Microbial Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases*; **2017**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00003-0>.
- (39) Panda, S. K.; Mishra, S. S.; Kayitesi, E.; Ray, R. C. Microbial-Processing of Fruit and Vegetable Wastes for Production of Vital Enzymes and Organic Acids: Biotechnology and Scopes. *Environ. Res.* **2016**, *146*, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.12.035>.
- (40) Pirota, R. D. P. B.; Delabona, P. S.; Farinas, C. S. Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation. **2014**. <https://doi.org/10.1007/s12155-013-9406-4>.
- (41) Naivy Y. Nava-Cruz, Miguel A. Medina-Morales, J.; L. Martinez, R. Rodriguez, and C. bal N. A. Agave Biotechnology: An Overview. **2014**, No. July. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>.
- (42) Martínez-ávila, G. C.; Aguilera-carbó, A. F.; Rodríguez-herrera, R. Fungal Enhancement of the Antioxidant Properties of Grape Waste. **2012**, 923–930. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0329-z>.
- (43) Heredia-Olea, E.; P??rez-Carrillo, E.; Serna-Sald??var, S. O. Production of Ethanol from Sweet Sorghum Bagasse Pretreated with Different Chemical and Physical Processes and Saccharified with Fiber Degrading Enzymes. *Bioresour. Technol.* **2013**, *134*, 386–390. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.162>.
- (44) Zhang, F.; Zhu, Z.; Wang, B.; Wang, P.; Yu, G.; Wu, M.; Chen, W.; Ran, W.; Shen, Q. Optimization of *Trichoderma Harzianum* T-E5 Biomass and Determining the Degradation Sequence of Biopolymers by FTIR in Solid-State Fermentation. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *49*, 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.037>.
- (45) Jun, H.; Kieselbach, T.; Jönsson, L. J. Enzyme Production by Filamentous Fungi: Analysis of the Secretome of *Trichoderma Reesei* Grown on Unconventional Carbon Source. *Microb. Cell Fact.* **2011**, *10* (1), 68. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-68>.
- (46) Gómez-garcía, R.; Medina-Morales, M. A.; Rodriguez, R.; Farruggia, B.; Picó, G.; Cristóbal, N. Production of a Xylanase by *Trichoderma Harzianum* (*Hypocrea Lixii*) in Solid-State Fermentation and Its Recovery by an Aqueous Two-Phase System. *Can. J. Biotechnol.* **2018**, *2*, 108–115.

- (47) Li, J. X.; Zhang, F.; Li, J.; Zhang, Z.; Bai, F. W.; Chen, J.; Zhao, X. Q. Rapid Production of Lignocellulolytic Enzymes by *Trichoderma Harzianum* LZ117 Isolated from Tibet for Biomass Degradation. *Bioresour. Technol.* **2019**, *292* (August), 122063. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122063>.
- (48) Wang, H.; Zhai, L.; Geng, A. Enhanced Cellulase and Reducing Sugar Production by a New Mutant Strain *Trichoderma Harzianum* EUA20. *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *xxx* (xxx). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.08.016>.
- (49) Jampala, P.; Tadikamalla, S.; Swathy, M. P. Concurrent Production of Cellulase and Xylanase from *Trichoderma Reesei* NCIM 1186 : Enhancement of Production by Desirability-Based Multi-Objective Method. *3 Biotech* **2017**. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0607-y>.
- (50) Kogo, T.; Yoshida, Y.; Koganei, K.; Matsumoto, H.; Watanabe, T.; Ogihara, J.; Kasumi, T. Production of Rice Straw Hydrolysis Enzymes by the Fungi *Trichoderma Reesei* and *Humicola Insolens* Using Rice Straw as a Carbon Source. *Bioresour. Technol.* **2017**, *233*, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.075>.
- (51) Silva, L. A. . O.; Terrasan, F. C. R.; Carmona, E. C. Purification and Characterization of Xylanases from *Trichoderma Inhamatum*. *EJBT* **2015**, *18* (4), 307–313. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.06.001>.
- (52) Raghuvanshi, S.; Deswal, D.; Karp, M.; Chander, R. Bioprocessing of Enhanced Cellulase Production from a Mutant of *Trichoderma Asperellum* RCK2011 and Its Application in Hydrolysis of Cellulose. *FUEL* **2014**, *124*, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.01.107>.
- (53) Liu, M.; Yu, H. Cocktail Production of an Endo- β -Xylanase and a β -Glucosidase from *Trichoderma Reesei* QM 9414 in *Escherichia Coli*. *Biochem. Eng. J.* **2012**, *68*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.07.003>.