



*Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*

ISSN: En trámite

Publicada desde 2009

JBCT - JOURNAL OF BIOPROCESS AND CHEMICAL TECHNOLOGY, año 2020 Volumen 12, No. 23, semestre enero – junio 2020, es una publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Coahuila. 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/](http://www.biochemtech.uadec.mx/)

Journal of Bioprocess and Chemical Technology

Editor Responsable Mónica L. Chávez González. Reserva de Derechos al uso exclusivo No. 04-2019-01112445500-203 **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 enero de 2020



# JBCT

# Journal of BioProcess and Chemical Technology

## 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 (**Biotechnología Universidad Autónoma de Chihuahua**); Dr. Zainul Akmar Zakaria (**Chemistry & Engineering. Universiti Teknologi Malaysia**); Dra. Anna Iliina Dimitrevna (**Nanomateriales y Biotechnología 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 (**Biotechnología 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 (**Biotechnología 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 (**Biotechnología y Microbiología. Kannur University**)

## Contenido

---

### Editorial

*Juan Alberto Ascacio Valdés*

### **Carotenoids: properties and bioprotective effects**

Carotenoides: propiedades y efectos bioprotectores

*Navarro-Macías, V.E., Ventura-Sobrevilla, J.M., Hernández-Almanza, A.Y., Chávez-González, M.L., Martínez-Hernández, J.L. Boone-Villa, V.D. y Cristóbal N. Aguilar\**

### **Gene Expression of a Putative Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein 2 During Cuticle Biosynthesis in Mango Fruit**

Expresión Génica de una Proteína Putativa de Transferencia de Lípidos 2 Anclada a Glicosilfosfatidilinositol Durante la Biosíntesis de Cutícula en Mango

*Tafolla-Arellano, J. C.1,2\*, Báez-Sañudo, R.3, Tiznado-Hernández, M. E.3*

### **Influencia de la aireación forzada y la densidad de empaque sobre la producción de elagitanasa por fermentación en estado sólido**

Influence of forced aeration and packing density on the ellagitannase production by solid-state fermentation

*Díaz-Herrera, R.1, Aguilar-Zarate, P.1, Buenrostro-Figueroa, J.J.2, Prado-Barragán, A.2, Ascacio, J.A. 1 y Aguilar C.N.1\**

## Editorial

La revista Journal of BioProcess and Chemical Technology (antes Acta Química Mexicana) de la Universidad Autónoma de Coahuila se complace de presentar, en su número 23, diversas aportaciones de literatura sobre compuestos y moléculas bioactivas y sus aplicaciones en diferentes procesos. En este número se abordarán las principales características de compuestos como los carotenoides, su importancia y las ventajas de diseñar procesos para ampliar su campo de investigación y aplicación. También se abordarán algunos aspectos y resultados de investigación sobre producción y expresión génica de proteínas, lo cual es de gran relevancia debido a las implicaciones de proceso que tiene en el campo de la generación de nuevos agentes biológicos con diferentes aplicaciones.

Se tratarán los aspectos y resultados más relevantes en el campo de las biomoléculas, lo cual sin duda, representa un campo de conocimiento importante y destaca la relevancia de la generación de nuevo conocimiento científico al respecto.

***Dr. Juan Alberto Ascacio Valdés***

## Carotenoids: properties and bioprotective effects

## Carotenoides: propiedades y efectos bioprotectores

Navarro-Macías, V.E., Ventura-Sobrevilla, J.M., Hernández-Almanza, A.Y., Chávez-González, M.L., Martínez-Hernández, J.L. Boone-Villa, V.D. y Cristóbal N. Aguilar\*

*Grupo de Investigación en Bioprocesos y Bioproductos. Departamento de Investigación en Alimentos. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Coahuila. Saltillo, 25280, México.*

\*Autor de correspondencia: [crisobal.aguilar@uadec.edu.mx](mailto:crisobal.aguilar@uadec.edu.mx)

Recibido: 9 de agosto de 2019

Aceptado: 13 de enero de 2020

### Resumen

Los carotenoides son un grupo de moléculas orgánicas liposolubles compuestos por dos o más unidades de hidrocarburos, gracias a su estructura química (dobles enlaces conjugados, tipo de grupos terminales estructurales y sustituyentes que contiene el oxígeno) cuenta con propiedades benéficas para la salud humana tales como actividad antioxidante y agente protector contra enfermedades como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas y diabetes, entre otras. Los carotenoides son de gran importancia en la industria alimenticia y farmacéutica ya que cuentan con aplicaciones como colorantes, nutracéuticos, suplementos alimenticios, medicamentos y cosméticos. Este tipo de compuestos se encuentran en la naturaleza en plantas, frutas, verduras y también pueden ser sintetizados por algunos microorganismos como hongos, microalgas y bacterias.

**Palabras clave:** carotenoides, liposoluble, actividad antioxidante, xantofilas, especies reactivas de oxígeno, microorganismos.

### Abstract

Carotenoids are a group of liposoluble organic molecules composed of two or more units of hydrocarbons, thanks to their chemical structure (conjugated double bonds, type of structural end groups and substituents containing oxygen) it has beneficial properties for human health such as antioxidant activity, prevent diseases like cancer, cardiovascular diseases, cataracts and diabetes, among others. Carotenoids are of great importance in the food and pharmaceutical industries because they have applications as colorants, nutraceutical, food supplements, drugs and cosmetics. These compounds are found in nature in plants, fruits, vegetables, and they can also be synthesized by some microorganisms such as fungi, algae and bacteria.

**Keywords:** Carotenoids, liposoluble, antioxidant activity, xanthophylls, reactive oxygen species, microorganisms.

## INTRODUCTION

Un gran número de estudios epidemiológicos han demostrado que las dietas ricas en frutas y verduras reducen el riesgo de desarrollar cáncer y otras enfermedades crónicas. La presencia de diversos compuestos fitoquímicos hace de las frutas y verduras, alimentos nutricionalmente muy valiosos.

Dentro de estos compuestos, los carotenoides son responsables de la pigmentación (particularmente amarilla, naranja y roja) en animales, plantas, y los microorganismos, pero crucialmente

también desempeñan funciones importantes, a menudo críticas, en los sistemas biológicos (Saini *et al.*, 2018).

La Tabla 1 presenta la distribución de carotenoides en diversos alimentos (Sluijs *et al.*, 2014). Los carotenoides tienen una amplia gama de aplicaciones en la industria de la salud y los nutracéuticos, por tal motivo, existe una demanda creciente del uso de carotenoides en la mejora de la calidad de los alimentos, además dicha demanda de carotenoides se ha incrementado en

el mercado global. Se estima que del 2016 al 2021, el mercado mundial de carotenoides se incrementará 0.3 mil millones de dólares a una tasa de crecimiento anual (CAGR) del 3.78% de 2016 a 2021 ([www.bccresearch.com](http://www.bccresearch.com)).

Debido a los cambios en el estilo de vida y la creciente conciencia sanitaria de la población promedio, la demanda de suplementos con beneficios para la salud (como aumentadores de presión de inmunidad y suplementos ricos en proteínas y vitaminas) ha aumentado.

Los carotenoides tienen varias propiedades medicinales y son ampliamente utilizados como prevención contra enfermedades como el cáncer, la diabetes y la catarata [1]. Los carotenoides también se utilizan en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos.

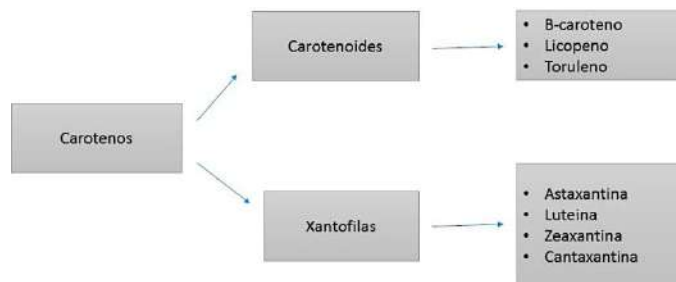
Los carotenoides son tetraterpenos formados por una cadena de 40 o más carbonos derivados del fitoeno (Sánchez *et al.*, 1999), pueden ser de dos clases: los carotenos, compuestos hidrocarbonados y las xantofilas, derivados oxigenados de los carotenos (Woodside *et al.*, 2015).

Más de 700 carotenoides se han caracterizado en la naturaleza; esta diversidad es probablemente debido a su ruta biosintética que ha sido demostrada en las plantas superiores y algas, pero también en bacterias y levaduras (Kaiser, *et al.*, 2007; Saini *et al.*, 2018). A pesar de la disponibilidad de una variedad de carotenoides naturales y sintéticos, sólo pocos han sido explotados comercialmente, incluyendo al  $\beta$ -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina, luteína y capsantina (Hernández-Almanza *et al.*, 2017).

Los carotenoides tienen la propiedad de absorber la luz, esto se deriva de la presencia de enlaces dobles conjugados; actualmente se sabe que las propiedades antioxidantes de los carotenoides están estrechamente relacionadas con su estructura química, incluyendo el número de dobles enlaces conjugados, el tipo de grupos terminales estructurales y sustituyentes que contiene el oxígeno (Fig. 1) (Marova *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2012).

**Tabla 1.** Distribución de carotenoides en diversos alimentos.

Alimento	Carotenoides mayoritarios
Zanahoria ( <i>Daucus carota</i> )	$\alpha$ y $\beta$ -caroteno Violaxantina, $\beta$ -criptoxantina, luteína,
Naranja ( <i>Citrus sinensis</i> )	zeaxantina
Mango ( <i>Mangifera indica</i> )	Violaxantina, $\beta$ -caroteno, Licopeno
Tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	Licopeno
Pimiento rojo ( <i>Capsicum anuum</i> )	Capsantina, capsorrubina
Melocoton ( <i>Prunus persica</i> )	$\beta$ -criptoxantina, luteína
Papaya ( <i>Carica papaya</i> )	$\beta$ -criptoxantina, $\beta$ -caroteno
Guayaba ( <i>Psidium guajava</i> )	Licopeno, $\beta$ -caroteno
Ciruela ( <i>Spondias lutea</i> )	$\beta$ -criptoxantina



**Figura 1.** Los carotenoides se clasifican de acuerdo a su estructura química: los carotenos son compuestos hidrocarbonados mientras que las xantofilas son compuestos hidroxilados.

Los antioxidantes ayudan a prevenir o retrasar el daño oxidativo y por lo tanto, también contribuyen a la prevención de algunas enfermedades generadas a partir de dicho estrés oxidativo. Es por eso que los carotenoides constituyen un grupo de moléculas de valor para los productos farmacéuticos, la medicina, los cosméticos y las industrias alimentarias (Nasrabadi y Razavi, 2011).

Estas propiedades funcionales de los carotenoides hacen que la demanda del mercado mundial crezca a una tasa del 2.9% por año (Venil *et al.*, 2013; Valduga *et al.*, 2014;).

El objetivo de este artículo es analizar las fuentes ricas en carotenoides, incluyendo tipos y caracterización, propiedades benéficas en la salud humana y aplicaciones, estudios recientes, características químicas y físicas, y aplicaciones industriales.

### CLASIFICACIÓN

Los carotenoides son un grupo diverso y generalizado de pigmentos solubles en grasa, sintetizados por las plantas y microorganismos pero no son sintetizados por animales (Rao y Rao, 2007). Pueden clasificarse en carotenoides, hidrocarburos que se pueden ciclar en uno o ambos extremos de la molécula y xantofilas, derivados oxigenados de carotenos (Fig. 1); generalmente se les denomina con nombres comunes que incluyen las variaciones estructurales de los anillos laterales, en especial la posición del enlace doble, en general, para los carotenos se usa el sufijo *-caroteno*, y para las xantofilas el sufijo *-ina* (Sánchez *et al.*, 1999; Woodside *et al.*, 2015).

#### Carotenos

##### *β*-caroteno

El *β*-caroteno es un caroteno que se compone de un sistema de polieno con 11 dobles enlaces conjugados y un anillo *β* en cada extremo de la cadena (Li, Wang, Chen, y Lu, 2015). Como resultado de esta estructura química específica (Figura 2), el *β*-caroteno tiene algunas propiedades relacionadas con la salud. En primer lugar, es un precursor de la vitamina A, además protege las células del daño oxidativo, puede prevenir enfermedades crónicas, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Martini *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2015).

En particular, este carotenoide puede aumentar las funciones inmunológicas mediante el aumento de la proliferación de linfocitos y poseer la capacidad antioxidante: se ha demostrado que el enriquecimiento de lipoproteínas de baja densidad con *β*-caroteno *in vitro* reduce la susceptibilidad de la LDL a la modificación oxidativa (Gammone, Riccioni, y D'orazio, 2015). También es esencial para mantener muchas actividades fisiológicas incluyendo el crecimiento de huesos (Chen *et al.*, 2015). Karamese *et al.* (Aksak Karamese *et al.*, 2015) encontraron que el *β*-caroteno puede suprimir los niveles de IL-1, IL-6, y la oxido nítrico sintasa (iNOS), que son los principales parámetros del proceso inflamatorio.

El *β*-caroteno al ser eliminador de radicales libres y como nutrimento antioxidante puede influir en el proceso de la opacificación de la lente ocular, o cataratogénesis, desempeñar

un papel importante en la prevención ya que esto puede ser iniciado por el daño oxidativo (Wang *et al.*, 2014).

La proporción de *β*-caroteno que puede ser absorbido, transportado y aprovechado por el cuerpo una vez que ha sido consumido (biodisponibilidad) depende de una serie de factores: el *β*-caroteno de los suplementos dietéticos se absorbe mejor que el *β*-caroteno de los alimentos, debido al contenido de aceite presente en el suplemento ya que el *β*-caroteno es soluble en aceite por lo tanto no puede absorberse sin la presencia de grasa (Verrijssen *et al.*, 2015).

##### Lycopeno

El licopeno (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) es un importante carotenoide de color rojo, intermedio de la ruta biosintética del *β*-caroteno (Hernández-Almanza *et al.*, 2017a), presente en algunas frutas y verduras tales como tomate, sandía, rosa mosqueta, toronja, guayaba, papaya, entre otros.

Es uno de los más de 600 carotenoides sintetizados por las plantas y microorganismos (Feofilova *et al.*, 2006; Patel, 2015). A diferencia de otros carotenoides, como el *α*- y *β*-caroteno, el licopeno no tiene actividad de provitamina A debido a que carece de la estructura de anillo *γ*-iónico común en estos carotenoides (Feofilova *et al.*, 2006).

Estudios recientes han demostrado que el tratamiento con licopeno protege contra varios tipos de cáncer tales como el cáncer de mama, cuello uterino, ovario, endometrio, pulmón, vejiga, cavidad oral, esófago, estómago, colon, páncreas, así mismo se ha comprobado una reducción del riesgo de 30 a 40% de cáncer de próstata. Sahin *et al.* (Sahin *et al.*, 2015) reportaron que la suplementación dietética con licopeno reduce el número y tamaño de los carcinomas renales porque TSC2 (esclerosis tuberosa) es fosforilada e inhibida por Akt (Proteína quinasa B) y suprime la señalización de mTOR (Diana de rapamicina en células de mamífero).

Por otro lado estudios epidemiológicos han sugerido que la ingesta de alimentos que contienen licopeno, así como las concentraciones de licopeno en la sangre, están inversamente relacionados con la incidencia de enfermedad cardiovascular (Erdman *et al.*, 2009).

La digestión de licopeno comienza en la luz gastrointestinal donde las enzimas digestivas pueden modular su bioaccesibilidad facilitando su liberación desde la matriz del alimento a las micelas. Las micelas entonces llevan licopeno hacia el lado apical del enterocito. La captación de licopeno no es sólo pasivo, como se pensaba anteriormente (Diwadkar-Navsariwala *et al.*, 2003), pero su transporte también es facilitado por dos proteínas de membrana, SR-BI (Receptor scavenger clase B tipo 1) codificada por SCARB1 (gen) y CD36 (grupo de diferenciación) (Borel *et al.*, 2015).

También es conocido que el licopeno inhibe los efectos nocivos de nitrilotriacetato férrico en el ADN en ratas, y para evitar la necrosis del hígado (Choudhari *et al.*, 2008). Recientemente (Boyacioglu *et al.*, 2016) evaluaron el potencial gastroprotector y anti-ulcerativo del licopeno y determinaron su efecto sobre la superóxido dismutasa, catalasa y mieloperoxidasa que son factores importantes en el desarrollo del daño gástrico. Los resultados muestran que 100

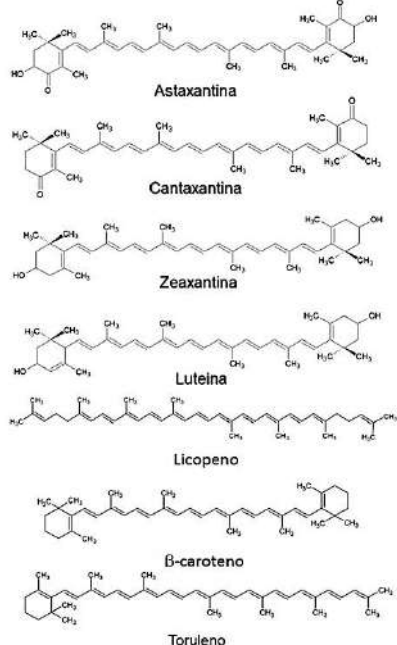
mg / kg de licopeno inhibió un 97.97% el daño gástrico. Por lo tanto, el licopeno puede ser útil en la prevención de daño gástrico.

El consumo de licopeno puede evitar tanto el envejecimiento y las enfermedades cardiovasculares, ya que elimina ROS, para inhibir la peroxidación de lípidos, e incluso para reforzar el sistema inmune (Gammone *et al.*, 2015)

### Toruleno

El toruleno es un pigmento sintetizado por algunas levaduras como *Rhodotorula glutinis* y *Sporobolomyces ruberrimus* (Britton *et al.*, 2009). Es un carotenoide sin sustituyentes en el anillo β y tiene una cadena lateral de polieno de once carbonos (Fig. 2). Estructuralmente cumple el requisito de provitamina A. La propiedad antioxidante está asociada con el doble enlace conjugado, teniendo más eficacia con un mayor número de enlaces dobles, por tal motivo se cree que este carotenoide también debe ser un antioxidante eficiente (Maldonado *et al.*, 2008).

El toruleno posee alrededor de 50% de la actividad provitamina A, en comparación con el β-caroteno (Sperstad *et al.*, 2006). Aunque las propiedades benéficas en la salud humana no se han estudiado (Maldonado *et al.*, 2008; Zoz *et al.*, 2015), se cree que el toruleno podría ser utilizado en la misma forma que otros carotenoides hidrocarbonados tales como el β-caroteno o licopeno, como colorante, aditivo en alimentos y cosméticos debido a su pigmentación roja (Zoz *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Estructura química de los principales carotenoides (Las propiedades benéficas de los carotenoides se relacionan con la estructura química de los mismos).

### XANTOFILAS

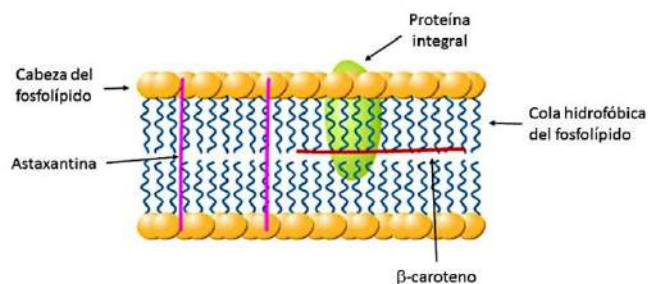
#### Astaxantina

La astaxantina es una xantofila roja (Solariet *al.*, 2011), químicamente se le conoce como 3,3'-dihidroxi-b,b-caroteno-

4,4'-diona (Sun *et al.*, 2015). Esta xantofila desempeña funciones biológicas y posee una serie de características deseadas para aplicaciones alimentarias, como el origen natural, la toxicidad nula, alta versatilidad y liposolubilidad (L. Zhou *et al.*, 2015). Existen algunos microorganismos que son ricos en astaxantina, se ha mencionado que el alga *Haematococcus pluvialis* acumula los más altos niveles de astaxantina en la naturaleza (Guerin, *et al.*, 2003).

Además de su función de pigmentación, la astaxantina ha mostrado una variedad fisiológica y farmacológica importante (L. Zhou *et al.*, 2015), se ha mostrado que la astaxantina tiene una capacidad antioxidante 500 veces mayor que la vitamina E y 10 veces más que el β-caroteno (Kindlund, 2011). Al ser un potente inhibidor de la fluorescencia de oxígeno singlete y un fuerte eliminador de radicales libres de oxígeno ayuda en la prevención de diferentes tipos de cáncer (Anarjan *et al.*, 2013). Diversos ensayos han establecido algunas propiedades benéficas en áreas tales como los ojos y la salud del cerebro, protección UV y salud de la piel, actividad anti-inflamatoria, la modulación del sistema inmune y la salud cardiovascular, entre otros (Capelliet *al.*, 2014). Esto se atribuye a sus propiedades químicas y estructurales que le permiten colocarse en un lugar estratégico en la membrana celular (Fig. 3) de una manera que ningún otro antioxidante puede hacerlo (Kindlund, 2011; Li *et al.*, 2015).

Zhou *et al.* (X. Zhou *et al.*, 2015) encontraron que el tratamiento con astaxantina puede reducir la glucosa en sangre, protege también las células de la glucosa y de esta manera ayuda a prevenir la diabetes (Preusset *al.*, 2011). La astaxantina no sólo protege a las mitocondrias y los glóbulos rojos de la oxidación, sino que también protege el corazón y las células musculares de los daños (Kindlund, 2011). Baralic *et al.* (Baralic *et al.*, 2013) descubrieron que la suplementación de astaxantina mejoró la respuesta de IgA y daño muscular atenuado, probablemente debido a la restauración del equilibrio redox, evitando así la inflamación inducida por el entrenamiento físico riguroso. Varios estudios han demostrado la actividad anticancerígena de la astaxantina. Por otro lado, Zhou *et al.* (L. Zhou *et al.*, 2015) demostraron que la astaxantina ejerce efectos protectores sobre la sepsis polimicrobiana por la disminución de las citocinas proinflamatorias, suprimiendo la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS), mejorando el estado antioxidante y la capacidad bactericida, y en última instancia conduce a la reducción de síndrome de disfunción orgánica múltiple (MODS).



**Figura 3.** Sitio de interacción de la astaxantina en la

membrana celular. La distribución de la astaxantina dentro de la membrana celular le permite tener mayores efectos benéficos que otros carotenoides.

#### *Luteína y Zeaxantina*

La luteína y la zeaxantina son pigmentos carotenoides liposolubles de color amarillo, conocidos como xantofilas debido a la presencia de dos grupos hidroxilo (Fig. 1). A diferencia de otros carotenos como el  $\beta$ -caroteno, la luteína y la zeaxantina no son precursores de la vitamina A. La luteína y la zeaxantina se concentran en la macula, que es la parte central de la retina (Berrow *et al.*, 2011); benefician la salud ocular debido a que absorben la radiación azul dañina de la luz y su fuerte potencial antioxidante. La cornea y el lente filtran la radiación UV permitiendo que la luz azul visible llegue a la retina (Vishwanathan y Johnson, 2013). Estructuralmente la luteína y la zeaxantina tienen estructuras químicas muy parecidas (Fig. 1) y tienen isómeros, pero no estereoisómeros. La principal diferencia entre ellos está en la ubicación de un doble enlace en uno de los anillos de los extremos (Ravi *et al.*, 2014) por esta razón la luteína tiene mayor eficiencia como filtro que la zeaxantina (Junghans *et al.*, 2001) ya que la luteína es capaz de orientarse tanto paralela como perpendicularmente al plano de la membrana, mientras que la zeaxantina sólo puede estar perpendicular a la membrana, las dos orientaciones de la molécula de luteína permiten la absorción de luz azul de todas las direcciones, lo cual no es el caso con la zeaxantina (Vishwanathan y Johnson, 2013).

La luteína es un fitoquímico de origen vegetal (Ozawa y Sasaki, 2014). Este isoprenoide es sintetizado por las plantas y algunos microorganismos, mientras que los animales los obtienen a partir de su dieta (Frede *et al.*, 2014). Las yemas de huevo, los vegetales verdes y el maíz, son una valiosa fuente de luteína en nuestra dieta (Severins *et al.*, 2015). Sin embargo, el consumo dietético de luteína es relativamente baja en comparación con los niveles en los que se han observado beneficios para la salud (Read *et al.*, 2015), ya que su disponibilidad biológica es limitada debido a su naturaleza lipofílica (Nidhi *et al.*, 2014). La luteína es ingerida, se incorpora en micelas y es absorbida desde el epitelio intestinal a la sangre por endocitosis; entonces circula sistémicamente para llegar a la retina, de esta manera reduce la incidencia de enfermedades relacionadas con la edad del ojo tales como cataratas. (Hayashi *et al.*, 2014) encontraron que algunos suplementos con luteína aumentan la actividad de los sistemas de eliminación de  $O_2$  en pacientes con cataratas. Las propiedades antioxidantes de luteína también pueden proteger la mácula del estrés oxidativo. Sedon *et al.* (Seddon *et al.*, 1994) demostraron que el consumo de alimentos ricos en luteína disminuye 43% el riesgo de la degeneración macular (AMD). Por otra parte la luteína puede reducir el daño de la piel inducido por la luz (Frede *et al.*, 2014). Al igual que los demás carotenoides, la luteína también posee potencial preventivo de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer, particularmente los de mama y pulmón.

La zeaxantina se encuentra en menor proporción en los alimentos en relación con la luteína, pero se acumula en un

grado mucho más alto que la luteína en la mácula central, indicando tal vez mayor importancia relativa para la fotoprotección (O'Hare *et al.*, 2015). Las fuentes dietéticas de zeaxantina incluyen maíz amarillo, pimiento rojo, jugo de naranja, melón dulce, mango y la yema de huevo de gallina. La zeaxantina también ha sido identificada en extractos de albaricoques, melocotones y melón (Ravi *et al.*, 2014). Distintos estudios sugieren que la ingesta dietética adecuada de zeaxantina sérica pueden ayudar a reducir el riesgo de incidencia de catarata, así como la necesidad de extracción de cataratas (Maci y Santos, 2015).

Debido a su naturaleza ligeramente hidrofílica, la luteína y la zeaxantina son capaces de saciar el oxígeno singlete con mayor eficacia en la fase de agua en comparación con los carotenoides hidrocarbonados completamente hidrófobos (Vishwanathan y Johnson, 2013).

#### *Torularrodina*

La torularrodina es uno de los productos finales en la biosíntesis de carotenoides. Se biosintetiza vía  $\gamma$ -caroteno el cual es un precursor del  $\beta$ -caroteno (Sakaki *et al.*, 2000). La torularrodina es el pigmento que lleva el estado de oxidación más alto y es más polar que otros pigmentos similares (Ungureanu *et al.*, 2013), tiene una considerable actividad antioxidante que ayuda a la estabilización de las membranas en condiciones de estrés (Zoz *et al.*, 2015) y tiene un efecto más potente que el  $\beta$ -caroteno sobre los radicales peróxido (Sakaki *et al.*, 2001).

Sakaki *et al.* (Sakaki *et al.*, 2001) evaluaron la descomposición de DPBF (2,5-difenil-3,4-benzofran) causada por oxígeno singlete generado a partir de EPA3-(1,4-epoxi-4-metil-1,4-dihidro-1-naftil) ácido propiónico, en presencia de  $\beta$ -caroteno y torularrodina. Cuando se añadieron el  $\beta$ -caroteno y la torularrodina a la misma concentración molar, la descomposición de DPBF en presencia de torularrodina era más lenta que en presencia de  $\beta$ -caroteno. Esto indicó que la torularrodina apaga de manera más efectiva el oxígeno singlete que el  $\beta$ -caroteno.

La torularrodina es el pigmento con el potencial de oxidación más alto en levaduras; la función foto-protectora de la torularrodina puede probablemente ser explicada por propiedades químicas de esta molécula (Moliné *et al.*, 2010). Los efectos en la salud humana no se han estudiado, sin embargo, las características estructurales de las moléculas de estos pigmentos, y teniendo en cuenta su actividad probada como pro-vitamina A y antioxidantes, es evidente que estas sustancias se pueden utilizar como alimentos y aditivos cosméticos (Zoz *et al.*, 2015).

#### *Cantaxantina*

La cantaxantina es un ceto-carotenoide color naranja-rojo que se encuentra en la naturaleza (Rostami *et al.*, 2014), puede ser sintetizado por algas, plantas, ciertas bacterias y hongos (Qiu *et al.*, 2013). La cantaxantina juega un papel importante en los animales; este carotenoide es utilizado en la pigmentación del salmón (Tolasa *et al.*, 2005), además participa en la protección de los tejidos contra los radicales libres oxidantes (Baker, 2001). La cantaxantina como un carotenoide de alto valor es

ampliamente utilizado en las industrias farmacéutica, cosmética, química, alimentaria y médica (Gharibzahedi *et al.*, 2013). Brizio *et al.* (Brizio *et al.*, 2013) mencionan que la cantaxantina tiene propiedades antioxidantes por lo cual podría proporcionar protección para la piel de la radiación UV. Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de alimentos que contienen  $\beta$ -caroteno, licopeno y otros carotenoides puede ser efectivo contra ciertos tipos de cáncer. Estudios médicos han confirmado que este es también el caso de la cantaxantina (Baker, 2001).

La demanda de cantaxantina ha incrementado debido a su efecto positivo como un ingrediente dietético o suplementario a sus atributos benéficos para la salud tales como antitumoral, anti-dermatosis, y agente colorante (Gharibzahedi *et al.*, 2013; Gharibzahedi *et al.*, 2014). Con base en la literatura científica, diversos reglamentos de seguridad alimentaria han elegido un consumo máximo de 0,03 mg de cantaxantina por kg de peso corporal por día, ya que el exceso de consumo puede tener efectos secundarios (Baker, 2001).

### OBTENCIÓN DE CAROTENOIDES

Los carotenoides son compuestos que presentan dobles enlaces en su estructura química, lo cual los hace susceptibles a sufrir reacciones de deterioro, de oxidación y de isomerización cuando se exponen a la luz, altas temperaturas y al oxígeno (Jørgensen y Skibsted, 1990; Aburaiet *et al.*, 2015). Por estas razones, la extracción de carotenoides se debe realizar en condiciones de ausencia de luz, a temperatura ambiente o menor, y en ausencia de oxígeno. Además se debe realizar lo más rápido posible, y a partir de tejidos frescos, para evitar la degradación por la acción conjunta de estos factores adversos (Pérez Gálvez y Garrido Fernández, 1997; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

Durante mucho tiempo se han utilizado extractos de plantas como fuente de carotenoides, en particular,  $\beta$ -caroteno y las xantofilas. Aunque las plantas siguen siendo importantes fuentes de carotenoides de origen natural, diversos procesos microbiológicos han sido explotados comercialmente para la producción de tales compuestos (Hernandez-Almanza *et al.*, 2014).

Existen diversas metodologías empleadas para la obtención de carotenoides a partir de fuentes vegetales y microorganismos; éstas pueden clasificarse en mecánicas y no mecánicas (físicas, químicas y enzimáticas) (Lee *et al.*, 2012). Dentro de los métodos convencionales de extracción de carotenoides se han empleado disolventes orgánicos a temperaturas relativamente altas, entre 40 y 60 °C. Sin embargo, el uso de disolventes orgánicos representa algunos problemas en la purificación del extracto (Amosova *et al.*, 2014). Algunas alternativas para la extracción de carotenoides es el ultrasonido, una técnica que ha demostrado ser particularmente eficaz para mejorar la extracción de compuestos lábiles al calor. Los efectos del ultrasonido de alta potencia en la mejora de extracción se atribuyen a la cavitación acústica que consiste en la formación, el crecimiento y colapso de microburbujas en el interior de un líquido presentado a las ondas sonoras de alta frecuencia.

La extracción asistida por ultrasonido se ha empleado para la extracción de carotenoides a partir de diferentes materiales

vegetales, en los últimos años ha mostrado gran eficiencia de extracción en comparación los métodos convencionales (Chemat *et al.*, 2011; Luengo *et al.*, 2014; Ordóñez-Santos *et al.*, 2015). Por otro lado, la extracción asistida por microondas (MAE), es un proceso que puede realizarse en muy corto tiempo y también menor cantidad de disolvente en comparación con los métodos de extracción con disolventes convencionales (Hiranvarachet *et al.*, 2013; Hiranvarachet y Devahastin, 2014).

Otros métodos son la extracción con líquidos a presión y extracción con fluidos supercríticos. Los líquidos a presión tienen la ventaja de una mayor solubilidad con aumento de la temperatura debido a la mayor difusión de analito de la matriz sólida para el disolvente a granel y la reducción de la viscosidad del disolvente, lo que facilita la penetración del disolvente en la matriz (Amosova *et al.*, 2014; Cardenas-Toro *et al.*, 2015). Los fluidos supercríticos son ampliamente aceptados para la extracción, purificación, cristalización, y las operaciones de fraccionamiento en muchas industrias y son conocidos por ser los fluidos de extracción más eficientes que los disolventes líquidos tradicionales (Goto *et al.*, 2015).

Posterior a la extracción, se realiza una cuantificación y separación de carotenoides, la cuantificación puede realizarse mediante métodos espectrofotométricos (Dere y Güneş, 1998). Para la separación e identificación de estos compuestos los métodos más utilizados son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y UHPLC conjunto con el detector de UV-visible (Luterotti *et al.*, 2013; Maurer *et al.*, 2014).

Uno de los retos tecnológicos más importantes en la producción de carotenoides a nivel mundial, es aquel que corresponde al proceso de separación y/o extracción de los compuestos de origen microbiano. En trabajos previos, el grupo de investigación en Bioprocesos y Bioproductos de la Universidad Autónoma de Coahuila en colaboración en investigadores del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Gachon (Gyeonggi-do, Corea del Sur) y del Centro de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Monterrey han reportado avances significativos en tema (Hernández-Almanza *et al.*, 2017a; 2017b; 2017c), sin embargo, es necesario llevar a cabo investigación tecnológica adicional que permita recuperar el 100% de los compuestos carotenoides intracelulares.

### CONCLUSIONES

Los carotenoides son de gran importancia a nivel industrial debido a sus diversas aplicaciones y en la medicina por sus propiedades benéficas para la salud. Aunque ya se han demostrado dichas propiedades en diversos estudios con diferentes carotenoides como el  $\beta$ -caroteno y la astaxantina aún falta explorar algunos carotenoides como el toruleno y la torularrodina ya que hay pocos reportes sobre sus propiedades benéficas. No obstante, la obtención de este tipo de compuestos tiene algunas limitantes, puesto que la estructura química de los carotenoides los hace fáciles de degradar y algunas técnicas para su obtención no son las más viables, es importante profundizar en la evaluación de distintos métodos de extracción y purificación que nos permitan lograr una alta estabilidad a las moléculas, ya que la demanda por el consumo

de carotenoides a partir de fuentes naturales está en un incremento constante.

## REFERENCIAS

- Aburai, N., Sumida, D., & Abe, K. (2015). Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae). *Algal Research*, 8, 30–36.
- Aksak Karamese, S., Toktay, E., Unal, D., Selli, J., Karamese, M., & Malkoc, I. (2015). The protective effects of beta-carotene against ischemia/reperfusion injury in rat ovarian tissue. *Acta Histochemica*, 117(8), 790–797.
- Amosova, a. S., Ivakhnov, a. D., Skrebets, T. E., Ulyanovskiy, N. V., & Bogolitsyn, K. G. (2014). Supercritical fluid extraction of carotenoids from shantane carrot. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 8(7), 963–966.
- Anarjan, N., Nehdi, I. A., & Tan, C. P. (2013). Influence of astaxanthin, emulsifier and organic phase concentration on physicochemical properties of astaxanthin nanodispersions. *Chemistry Central journal*, 7(1), 127.
- Baker, R. T. M. (2001). Canthaxanthin in aquafeed applications: Is there any risk? *Trends in Food Science and Technology*, 12(7), 240–243.
- Baralic, I., Djordjevic, B., Dikic, N., Kotur-Stevuljevic, J., Spasic, S., Jelic-Ivanovic, Z., Radivojevic, N., Andjelkovic, M., & Pejic, S. (2013). Effect of astaxanthin supplementation on paraoxonase 1 activities and oxidative stress status in young soccer players. *Phytotherapy Research*, 27(10), 1536–1542.
- Berrow, E. J., Bartlett, H. E., & Eperjesi, F. (2011). Do lutein, zeaxanthin and macular pigment optical density differ with age or age-related maculopathy? *e-SPEN*, 6(4), e197–e201.
- Borel, P., Desmarchelier, C., Nowicki, M., & Bott, R. (2015). Lycopene bioavailability Is associated with a combination of genetic variants. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 238–244.
- Boyacioglu, M., Kum, C., Sekkin, S., Yalinkilinc, H. S., Avci, H., Epikmen, E. T., & Karademir, U. (2016). The effects of lycopene on DNA damage and oxidative stress on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Clinical Nutrition*, 35(2), 428–435.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2009). Carotenoids. Volume 5: *Nutrition and Health*.
- Brizio, P., Benedetto, A., Righetti, M., Prearo, M., Gasco, L., Squadrone, S., & Abete, M. C. (2013). Astaxanthin and canthaxanthin (xanthophyll) as supplements in rainbow trout diet: In vivo assessment of residual levels and contributions to human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10954–10959.
- Capelli, B., Bagchi, D., & Cysewski, G. R. (2014). Synthetic astaxanthin is significantly inferior to algal-based astaxanthin as an antioxidant and may not be suitable as a human nutraceutical supplement. *Nutrafoods*, 12(4), 145–152.
- Cardenas-Toro, F. P., Alcázar-Alay, S. C., Coutinho, J. P., Godoy, H. T., Forster-Carneiro, T., & Meireles, M. A. a. (2015). Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. *Food and Bioproducts Processing*, 94, 90–100.
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835.
- Chen, G., Zhu, Y.-Y., Cao, Y., Liu, J., Shi, W., Liu, Z., & Chen, Y. (2015). Association of dietary consumption and serum levels of vitamin A and  $\beta$ -carotene with bone mineral density in Chinese adults. *Bone*, 79, 110–115.
- Choudhari, S. M., Ananthanarayan, L., & Singhal, R. S. (2008). Use of metabolic stimulators and inhibitors for enhanced production of  $\beta$ -carotene and lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 and 2896. *Bioresource Technology*, 99(8), 3166–3173.
- Dere, Ş., & Güneş, T. (1998). Spectrophotometric determination of chlorophyll - A, B and total caretenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*, 22, 13–16.
- Diwadkar-Navsariwala, V., Novotny, J. A., Gustin, D. M., Sosman, J. A., Rodvold, K. A., Crowell, J. A., Stacewicz-Sapuntzakis, M., & Bowen, P. E. (2003). A physiological pharmacokinetic model describing the disposition of lycopene in healthy men. *Journal of lipid research*, 44(10), 1927–39.
- Erdman, J. W., Ford, N. a., & Lindshield, B. L. (2009). Are the health attributes of lycopene related to its antioxidant function? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 229–235.
- Feofilova, E. P., Tereshina, V. M., Memorskaia, a S., Dul'kin, L. M., & Goncharov, N. G. (2006). Fungal lycopene: the biotechnology of its production and prospects for its application in medicine. *Mikrobiologia*, 75(6), 725–730.
- Frede, K., Henze, A., Khalil, M., Baldermann, S., Schweigert, F. J., & Rawel, H. (2014). Stability and cellular uptake of lutein-loaded emulsions. *Journal of Functional Foods*, 8(1), 118–127.
- Gammone, M. A., Riccioni, G., & D'orazio, N. (2015). Carotenoids: potential allies of cardiovascular health?. *1(7)*, 1–11. doi:10.3402/fnr.v59.26762
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H., & Mousavi, M. (2014). Feeding strategies for the improved biosynthesis of canthaxanthin from enzymatic hydrolyzed molasses in the fed-batch fermentation of *Dietzia natronolimnaea* HS-1. *Bioresource Technology*, 154, 51–58.
- Gharibzahedi, S. M. T., Razavi, S. H., & Mousavi, S. M. (2013). Microbial canthaxanthin: Perspectives on biochemistry and biotechnological production. *Engineering in Life Sciences*, 13(4), 408–417.
- Goto, M., Kanda, H., Wahyudiono, & Machmudah, S. (2015). Extraction of carotenoids and lipids from algae by supercritical CO<sub>2</sub> and subcritical dimethyl ether. *The Journal of Supercritical Fluids*, 96, 245–251.
- Guerin, M., Huntley, M. E., & Olaiwola, M. (2003).

- Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210–216.
- Hayashi, R., Hayashi, S., Arai, K., Sakai, M., Okamoto, H., & Chikuda, M. (2014). The gender-differentiated antioxidant effects of a lutein-containing supplement in the aqueous humor of patients with senile cataracts. *Experimental Eye Research*, 129, 5–12.
- Hernandez-Almanza, A., Montanez, J. C., Aguilar-Gonzalez, M. a., Martmez-Avila, C., Rodriguez-Herrera, R., & Aguilar, C. N. (2014). *Rhodotorula glutinis* as source of pigments and metabolites for food industry. *Food Bioscience*, 5, 64–72.
- Hernández-Almanza, A., Muñiz-Márquez, D.B., de la Rosa, O., Navarro, V., Martínez-Medina, G., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar, C.V. (2017a). Chapter 4 - Microbial Production of Bioactive Pigments, Oligosaccharides, and Peptides. In Handbook of Food Bioengineering, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban, *Food Biosynthesis*, Academic Press, Pages 95-134, ISBN 9780128113721,
- Hernandez-Almanza, A., Park, J. K., Carlos-Interior, N. E., Fuentes-Aviles, J. G., & Aguilar, C. N. (2017b). Recovery and Analysis of the Biological Activity of Lycopene Produced by *Rhodotorula glutinis* P4M422. *International Journal of Food And Biosystems Engineering*, 5:52-59.
- Hernández-Almanza, A., Navarro-Macías, V., Aguilar, O., Aguilar-González, M. A., & Aguilar, C. N. (2017c). Carotenoids extraction from *Rhodotorula glutinis* cells using various techniques: A comparative study. *Indian Journal of Experimental Biology*, 55: 479-484.
- Hiranvarachat, B., & Devahastin, S. (2014). Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels. *Journal of Food Engineering*, 126, 17–26.
- Hiranvarachat, B., Devahastin, S., Chiewchan, N., & Vijaya Raghavan, G. S. (2013). Structural modification by different pretreatment methods to enhance microwave-assisted extraction of b-carotene from carrots. *Journal of Food Engineering*, 115(2), 190–197.
- Jørgensen, K., & Skibsted, L. (1990). Light sensitivity of carotenoids used as food colours. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 190, 306–313.
- Junghans, a, Sies, H., & Stahl, W. (2001). Macular pigments lutein and zeaxanthin as blue light filters studied in liposomes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 391(2), 160–164.
- Kaiser, P., Surmann, P., Vallentin, G., & Fuhrmann, H. (2007). A small-scale method for quantitation of carotenoids in bacteria and yeasts. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 142–149.
- Kindlund, P. J. (2011). Astaxanthin Boosts muscle performance. *Nutra foods*, 10(2), 49–53.
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89–101.
- Li, X., Wang, G., Chen, D., & Lu, Y. (2015).  $\beta$ -Carotene and astaxanthin with human and bovine serum albumins. *Food Chemistry*, 179, 213–221.
- Luengo, E., Condón-Abanto, S., Condón, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2014). Improving the extraction of carotenoids from tomato waste by application of ultrasound under pressure. *Separation and Purification Technology*, 136, 130–136.
- Luterotti, S., Marković, K., Franko, M., Bicanic, D., Madžgalj, A., & Kljak, K. (2013). Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determination of carotenoids in foods. *Food chemistry*, 140(1–2), 390–7.
- Maci, S., & Santos, R. (2015). The beneficial role of lutein and zeaxanthin in cataracts. *Nutrafoods*, 14(2), 63–69.
- Maldonado, I. R., Rodriguez-Amaya, D. B., & Scamparini, A. R. P. (2008). Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*, 107(1), 145–150.
- Marova, I., Carnecka, M., Halienova, a., Certik, M., Dvorakova, T., & Haronikova, a. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. *Journal of Environmental Management*, 95(SUPPL.), S338–S342.
- Martini, S., D’Addario, C., Bonechi, C., Leone, G., Tognazzi, A., Consumi, M., Magnani, A., & Rossi, C. (2010). Increasing photostability and water-solubility of carotenoids: Synthesis and characterization of b-carotene-humic acid complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 101(3), 355–361.
- Maurer, M. M., Mein, J. R., Chaudhuri, S. K., & Constant, H. L. (2014). An improved UHPLC-UV method for separation and quantification of carotenoids in vegetable crops. *Food chemistry*, 165, 475–82.
- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 209–215.
- Moliné, M., Flores, M. R., Libkind, D., Diéguez, M. D. C., Farías, M. E., & van Broock, M. (2010). Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 9(8), 1145–1151.
- Nasrabadi, M. R. N., & Razavi, S. H. (2011). Optimization of b-carotene production by a mutant of the lactosepositive yeast *Rhodotorulaacheniorum* from whey ultrafiltrate. *Food Science and Biotechnology*, 20(2), 445–454.
- Nidhi, B., Ramaprasad, T. R., & Baskaran, V. (2014). Dietary fatty acid determines the intestinal absorption of lutein in lutein deficient mice. *Food Research International*, 64, 256–263.
- O’Hare, T. J., Fanning, K. J., & Martin, I. F. (2015).

- Zeaxanthin biofortification of sweet-corn and factors affecting zeaxanthin accumulation and colour change. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 572, 184–187.
- Ordóñez-Santos, L. E., Pinzón-Zarate, L. X., & González-Salcedo, L. O. (2015). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 560–566.
- Ozawa, Y., & Sasaki, M. (2014). Lutein and Oxidative Stress-Mediated Retinal Neurodegeneration in Diabetes. In *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (pp. 223–229). Elsevier.
- Patel, S. (2015). Antioxidants in Endodontics: A Strategic Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(5), 12–15.
- Pérez Gálvez, a., & Garrido Fernández, J. (1997). Termodegradación de carotenoides en el pimentón. *Grasas y Aceites*, 48(5), 290–296.
- Preuss, H. G., Echard, B., Yamashita, E., & Perricone, N. V. (2011). High dose astaxanthin lowers blood pressure and increases insulin sensitivity in rats: Are these effects interdependent? *International Journal of Medical Sciences*, 8(2), 126–138.
- Qiu, D., Zhu, W.-L., Tang, C.-K., Shi, L.-F., & Gao, H.-Q. (2013). Identification of the Composition of Isomeric Canthaxanthin Sample by NMR, HPLC, and Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 7(3), 597–605.
- Rao, a. V., & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216.
- Ravi, K. B., Raghunatha Reddy, K. R., Shankaranarayanan, J., Deshpande, J. V., Juturu, V., & Soni, M. G. (2014). Safety evaluation of zeaxanthin concentrate (OmniXan™): Acute, subchronic toxicity and mutagenicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 30–39.
- Read, A., Wright, A., & Abdel-Aal, E.-S. M. (2015). In vitro bioaccessibility and monolayer uptake of lutein from wholegrain baked foods. *Food Chemistry*, 174, 263–269.
- Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., Chisté, R. C., & Mercadante, A. Z. (2012). Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxyl radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure-activity relationship. *Food Chemistry*, 135(3), 2103–2111.
- Rostami, F., Razavi, S. H., Sepahi, A. A., Mohammad, S., & Gharibzadeh, T. (2014). Canthaxanthin biosynthesis by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 : effects of inoculation and aeration rate, 456, 447–456.
- Sahin, K., Cross, B., Sahin, N., Ciccone, K., Suleiman, S., Osunkoya, A. O., Master, V., Harris, W., Carthon, B., Mohammad, R., Bilir, B., Wertz, K., Moreno, C. S., Walker, C. L., & Kucuk, O. (2015). Lycopene in the prevention of renal cell cancer in the TSC2 mutant Eker rat model. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 572, 36–39.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Komemushi, S., Namikawa, K., & Miki, W. (2001). Torularhodin as a Potent Scavenger against Peroxyl Radicals Isolated from a Soil Yeast, *Rhodotorula glutinis*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 30, 1–10.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Satonaka, K. Y., Miki, W., Fujita, T., & Komemushi, S. (2000). Properties of a high-torularhodin-producing mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(2), 203–205.
- Sakaki, H., Nakanishi, T., Tada, A., Miki, W., & Komemushi, S. (2001). Activation of torularhodin production by *Rhodotorula glutinis* using weak white light irradiation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(3), 294–297.
- Sánchez, A., Flores-Contrera L. Langley, E. Martín, R., Maldonado G., y Sánchez, S. (1999). Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 41, 175–191.
- Seddon, J. M., Christen, W. G., Manson, J. E., LaMotte, F. S., Glynn, R. J., Buring, J. E., & Hennekens, C. H. (1994). The use of vitamin supplements and the risk of cataract among US male physicians. *American Journal of Public Health*, 84(5), 788–792.
- Severins, N., Mensink, R. P., & Plat, J. (2015). Effects of lutein-enriched egg yolk in buttermilk or skimmed milk on serum lipids & lipoproteins of mildly hypercholesterolemic subjects. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(2), 210–217.
- Sluijs, I., Cadier, E., Beulens, J. W. J., van der A, D. L., Spijkerman, a. M. W., & van der Schouw, Y. T. (2014). Dietary intake of carotenoids and risk of type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(4), 376–381.
- Solari, S. G., Vílchez, J. B., Vivar, J. L., & Hermosilla, N. B. (2011). Astaxanthin : natural antioxidants with various applications in cosmetics. *Biofarbo*, 19(2), 6–12.
- Sperstad, S., Lutnæs, B. F., Stormo, S. K., Liaaen-Jensen, S., & Landfald, B. (2006). Torularhodin and torulene are the major contributors to the carotenoid pool of marine *Rhodospiridium babjevae* (Golubev). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(4), 269–273.
- Sun, H., Geng, Z., Duan, L., Yang, M., Guan, B., & Kong, Q. (2015). Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 186, 67–73.
- Tolasa, S., Cakli, S., & Ostermeyer, U. (2005). Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. *European Food Research and Technology*, 221(6), 787–791.
- Ungureanu, C., Marchal, L., Chirvase, A. A., & Foucault, A. (2013). Centrifugal partition extraction, a new method for direct metabolites recovery from culture broth: Case study of torularhodin recovery from *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 132, 406–409.
- Valduga, E., Rausch Ribeiro, A. H., Cence, K., Colet, R., Tiggemann, L., Zeni, J., & Toniazzo, G. (2014). Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. *Biocatalysis and*

- Agricultural Biotechnology, 3(2), 207–213.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065–1079.
- Verrijssen, T. a. J., Verkempinck, S. H. E., Christiaens, S., Van Loey, A. M., & Hendrickx, M. E. (2015). The effect of pectin on in vitro  $\beta$ -carotene bioaccessibility and lipid digestion in low fat emulsions. *Food Hydrocolloids*, 49, 73–81.
- Vishwanathan, R., & Johnson, E. J. (2013). Carotenoids and Human Health, 215–235.
- Wang, A., Han, J., Jiang, Y., & Zhang, D. (2014). Association of vitamin A and  $\beta$ -carotene with risk for age-related cataract: A meta-analysis. *Nutrition*, 30(10), 1113–1121.
- Woodside, J. V., McGrath, A. J., Lyner, N., & McKinley, M. C. (2015). Carotenoids and health in older people. *Maturitas*, 80(1), 63–68.
- Zhou, L., Gao, M., Xiao, Z., Zhang, J., Li, X., & Wang, A. (2015). Protective effect of astaxanthin against multiple organ injury in a rat model of sepsis. *Journal of Surgical Research*, 195(2), 559–567.
- Zhou, X., Zhang, F., Hu, X., Chen, J., Wen, X., Sun, Y., Liu, Y., Tang, R., Zheng, K., & Song, Y. (2015). Inhibition of inflammation by astaxanthin alleviates cognition deficits in diabetic mice. *Physiology & Behavior*, 151, 412–420.
- Zoz, L., Carvalho, J. C., Soccol, V. T., Casagrande, T. C., & Cardoso, L. (2015). Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(2), 278–288.

## Gene Expression of a Putative Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein 2 During Cuticle Biosynthesis in Mango Fruit

### Expresión Génica de una Proteína Putativa de Transferencia de Lípidos 2 Anclada a Glicosilfosfatidilinositol Durante la Biosíntesis de Cutícula en Mango

Tafolla-Arellano, J. C.<sup>1,2\*</sup>, Báez-Sañudo, R.<sup>3</sup>, Tiznado-Hernández, M. E.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa Docente de Ingeniero en Biotecnología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

<sup>2</sup>Núcleo Básico del Posgrado en Ciencias en Fitomejoramiento, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, 25315. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

<sup>3</sup>Coordinación de Alimentos de Origen Vegetal, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), 83304. Hermosillo, Sonora, México.

\*Autor de correspondencia: [jtafare@uaaan.edu.mx](mailto:jtafare@uaaan.edu.mx)

Recibido: 9 de agosto de 2019

Aceptado: 13 de enero de 2020

#### Abstract

Mango fruit (*Mangifera indica* L.) is highly perishable mainly due to desiccation, which increases the postharvest losses. The cuticle plays a role in controlling the water loss and gas diffusion, pathogen and insect-interactions, among others. The cuticle biosynthesis requires the transport of lipids from epidermal cells through the plant cell wall by glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer proteins (LTPGs). The objective of this work was to identify a putative LTPG2 gene of mango (MiLTPG2) and correlate its expression with the cuticle accumulation during mango fruit ontogeny. The *in silico* analyses showed that MiLTPG2 contains the three domains of the LTPG proteins: a signal peptide, a lipid transfer and a transmembrane domain. The lipid transfer domain contains the characteristic eight highly conserved cysteine residues. The cuticle accumulation showed a continuous pattern, characterized by deposition during fruit development and involving substantial accumulation during ripening/overripening. The MiLTPG2 gene showed a 7.48-fold change increase in expression during late stages of cuticle biosynthesis (153 DAF) as compared with 15 DAF. This increase correlated with the highest amount of cuticle accumulation (2100 µg/cm<sup>2</sup>). This study provides the first insight to understand the putative role of MiLTPG2 gene in cuticle biosynthesis in mango fruit.

**Keywords:** Cuticle, Gene Expression, Ontogeny, Mango, MiLTPG2.

#### INTRODUCTION

Mango fruit (*Mangifera indica* L.) is highly perishable fleshy tropical fruit and have a limited shelflife and global distribution, mainly due to postharvest desiccation and senescence. Although is an economical crop in the world, the scarce genomics resources are the principal limiting to carry out research at the molecular level for many biological processes in mango (Tafolla *et al.*, 2017). The fruit exocarp provides mechanical strength and plays an important role in shelf life. Furthermore, it is composed of the cuticle, single-cell

epidermal layer and several collenchymatous cell layers (Mintz-Oronet *et al.*, 2008). The cuticle is a hydrophobic layer that acts as an important surface barrier between the fruit and its environment, composed mostly of cutin and wax lipids (Kunst and Samuels, 2003). The major cuticle roles is to control water loss and gas diffusion (Riederer and Schreiber, 2001). Besides, cuticle plays an important role in fruit quality and postharvest shelf life by controlling desiccation, microbial infection and physiological disorders (Martin and Rose, 2014;

Tafolla *et al.*, 2018). Therefore, the knowledge regarding the cuticle biosynthesis is fundamental for the improvement of fruit quality. The cuticle biosynthesis comprises three processes: a) biosynthesis of lipids and elongation to form monomers; b) transport and export; and c) cuticle assembly (Tafolla *et al.*, 2018). In the second process, after the different wax components have been exported from the epidermal cell, they must cross the hydrophilic cell wall to reach the cuticle. The lipid transfer proteins (LTPs) have been proposed to be involved in cuticular transport across the cell wall because they are abundantly expressed in the epidermis, are secreted into the apoplast and are small enough to transverse the cell wall (Kader, 1996). LTPs are characterized by a high isoelectric point (pI ~9) and a characteristic eight- cysteine motif: C . . C . . CC . . CXC . . C . . C which is essential for the lipid-binding cavity formation (Kader, 1996; Yeats and Rose, 2008).

The LTPs had been proposed to play a role in cuticle biosynthesis in different species, e.g., carrot (Sterket *et al.*, 1991), broccoli (Pyee *et al.*, 1994), tobacco (Cameron *et al.*, 2006), among others. Yeats *et al.* (2010) reported changes in the regulation of genes encoding LTPs correlating with the cuticle biosynthesis during tomato fruit development. However,

Borneret *et al.* (2002) identified in *Arabidopsis* 18 glycosylphosphatidylinositol anchored lipid-transfer proteins known as LTPG. These proteins are composed of a range between 140 to 204 amino acids and therefore are somewhat larger than LTPs, which are less than 120 amino acids. The Cys residues are also conserved in the 18 LTPGs, suggesting that they have a similar fold as the LTPs and an extracellular location. Also, Gene Ontology analyses strongly suggest that the LTPGs play a role in the synthesis or deposition of cuticular waxes (Edstamet *et al.*, 2013).

Kim *et al.* (2012) showed that the protein that encodes AtLTPG2 was targeted to the plasma membrane via the vesicular trafficking system and mainly expressed in stem epidermal peels. In the *ltpg2* mutant, the composition of the cuticular wax was significantly altered in the stems and siliques. Also, it was recorded a reduction in the amount of the C<sub>29</sub> alkane, which is the major component of cuticular waxes. Besides, it was reported that LTPG2 is functionally overlapped with LTPG/LTPG1 during cuticular wax export (Kim *et al.*, 2012). The objective of this work was to identify a putative LTPG2 gene of mango (MiLTPG2) and correlate its expression with the cuticle accumulation during mango fruit ontogeny.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant materials

Mangoes flowers cv. 'Keitt' were tagged, then hand harvested every 15 days after flowering (DAF) until ripening at a commercial orchard and packinghouse located at El Porvenir, Ahome, Sinaloa, Mexico ([www.agricoladaniella.com.mx](http://www.agricoladaniella.com.mx)). Also, mangoes at the fully mature-green stage were stored at 20°C and 60-65% relative humidity during 18 days and sampled every six days. In each harvesting point, samples of mango peel tissue were isolated and immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80° C for real-time quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analysis.

### RNA isolation and cDNA synthesis for developmental time course

Peel tissue samples from three fruits were pooled together to create one biological replicate and the extraction was carried out in three independent biological replicates for each mango developmental stage. Total RNA was extracted from frozen mango fruit peel using hot borate method (Wan and Wilkins, 1994). 2 µg of total DNase-treated RNA was used for first strand cDNA synthesis using SuperScript II reverse transcriptase and oligo(dT) primers (Invitrogen. Carlsbad, CA 92008. USA), according to the manufacturer's instructions.

### Real-time quantitative reverse transcription PCR

The MiLTPG2 sequence was obtained from the Mango RNA-Seq Database (<http://bioinfo.bti.cornell.edu/cgi-bin/mango/index.cgi>, Tafolla-Arellano *et al.*, 2017) based on previous mango peel transcriptome analysis and the *Arabidopsis* gene sequences (<https://www.arabidopsis.org/>) using Basic Local Alignment Search Tool (Altschulet *et al.*,

1997). The coding DNA sequence (CDS) and amino acid sequence deduced were obtained using Open Reading Frame Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), the signal peptide was predicted by Signal-3L (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Signal-3L/>, Hong-Bin and Kuo-Chen, 2007; Yi-Ze Zhang and Hong-Bin Shen, 2017), the GPI domain was predicted by PredGPI predictor (<http://gpqr2.biocomp.unibo.it/gpipe/index.htm>, Pierleoni *et al.*, 2008) and the amino acid composition of protein by ProtParam tool (<https://web.expasy.org/protparam/>, Gasteiger *et al.*, 2005). The qRT-PCR experiments were performed using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primers utilized were designed according to the protocol described in Thornton and Basu (2011). The sequence of the MiLTPG2 primer forward and reverse are: 5'→3' TTAAGCTCCCTTCTGTCTGC and 5'→3' GCAGCTAAACCAGGCACG, respectively.

The cDNA samples were diluted 5-fold with water and 1 µl was used as a template for each 20 µl quantitative PCR, prepared using HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) in biological triplicates. The thermal cycling conditions were as follows: 2 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The specificity of the PCR products was determined by high-resolution melt curve analysis, gel electrophoresis and by DNA sequencing carried out at Macrogen (Macrogen Inc., Seoul, South Korea).

Statistical analysis of relative expression results was carried out using the relative expression method (Livak&Schmittgen, 2001), with MiActin1 (GenBank accession Number JF737036) as the reference gene (Luo *et al.*, 2013). The sequences for amplification of MiActin1 gene forward and reverse are 5'→3' CGTTCTGTCCCTCTATGCCA and 5'→3' AGATCACGGCCAGCAAGATC, respectively. The fold

change expression of MiLTPG2 was calculated for the different sampling points.

**Isolation and quantification of the cuticle fruit**

Three replicate samples, each consisting of 10 exocarp discs, were collected for each developmental stage. The cuticles and gravimetric analysis during mango ontogeny were carried out as previously described by Petit-Jiménez *et al.*(2007). Data were analyzed by using variance analysis based on a completely randomized design with a significance level of 5%. Tukey test was run when significant differences were found.

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Identification of a putative gene encoding glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2**

This is the first report of a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein 2 in mango (MiLTPG2). There is a report of LTPG2 gene in *Arabidopsis*(Kim *et al.*, 2012), therefore, we will compare our findings with that information.

MiLTPG2 (MIN029156) ortholog to AtLTPG2 (AT3G43720) showed a 43.20% of protein identity. Furthermore, MiLTPG2 was predicted to have a composition of 190 amino acids (Table 1), with a molecular weight of 18,951 Da and a theoretical isoelectric point of 4.52 similar to AtLTPG2. Conversely, LTPs are characterized for having an isoelectric point of about ~9 (Yeats and Rose, 2008). Also, this protein does not contain any tryptophan residues in agreement with the amino acid composition of LTPs previously reported (Kader, 1996).

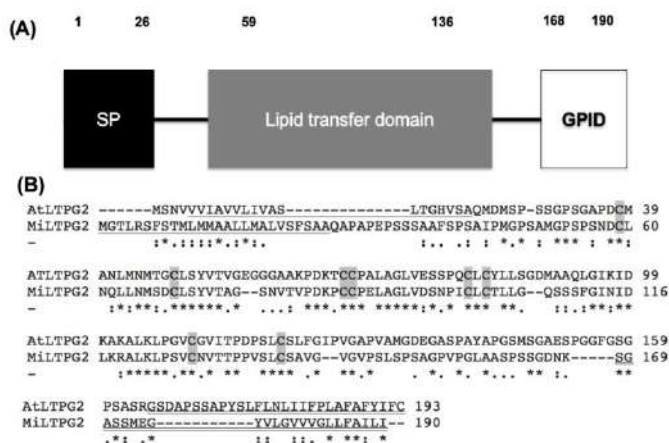
MiLTPG2 contains the three different domains characteristic of the LTPG proteins: a signal peptide domain, a lipid transfer domain and a transmembrane domain (Fig. 1B). Analysis with the Signal-3L engine showed that the signal peptide domain is encoded by the first 26 amino acids. The lipid transfer domain contains the characteristic eight highly conserved cysteine residues at positions 59, 69, 86, 87, 100, 101, 126 and 136, which agrees with the characteristic eight-cysteine motif (C..C..CC..CXC..C..C) reported in LTPs (Yeats and Rose, 2008). Cysteine residues contribute to four disulfide bonds, which are known to be essential for the formation of the lipid-binding cavity (Kader, 1996). Finally, the C-terminal end (168-189 amino acid residues) was predicted with high probability to encode a glycosylphosphatidylinositol-anchored (GPI) transmembrane domain with a serine residue located at position 168 of the omega site with a specificity of 100% (Figure 1C). Similar results were reported by Kim *et al.* (2012) for AtLTPG2, which was predicted to have a signal peptide, required for protein secretion, composed of 18 amino acid residues located within the positions 5–22 at the N-terminal end. Also, this protein showed the characteristic eight highly conserved cysteine residues at positions 38, 48, 67, 68, 81, 83, 110 and 120. Finally, it was identified a GPI transmembrane domain in serine residue at position 170 of the omega site.

Studies in *Arabidopsis* showed that the AtLTPG1 and AtLTPG2 are targeted to the plasma membrane via the

vesicular trafficking system (Lee *et al.*, 2009, De Bono *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2012). Based on GPI domain identified and those findings, we had hypothesized that MiLTPG2 is also localized to the plasma membrane, although, further experimental evidence is needed to prove this statement.

**Table 1.** MiLTPG2 amino acid protein composition.

Amino Acid	Frequency	(%)	Amino Acid	Frequency	(%)
Ala (A)	20	10.5	Lys (K)	4	2.1
Arg (R)	2	1.1	Met (M)	9	4.7
Asn (N)	8	4.2	Phe (F)	5	2.6
Asp (D)	6	3.2	Pro (P)	20	10.5
Cys (C)	8	4.2	Ser (S)	31	16.3
Gln (Q)	3	1.6	Thr (T)	7	3.7
Glu (E)	3	1.6	Trp (W)	0	0
Gly (G)	16	8.4	Tyr (Y)	2	1.1
His (H)	0	0	Val (V)	16	8.4
Ile (I)	6	3.2	Pyl (O)	0	0
Leu (L)	24	12.6	Sec (U)	0	0

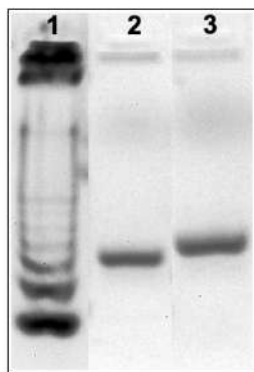


**Figure 1.** Identification of MiLTPG2 protein. (A) Schematic representation of the different MiLTPG2 domains. SP, signal peptide. GPID, Glycosylphosphatidylinositol-Anchored domain. The numbers are indicating the location of the amino acid in the sequence of the LTPG2 protein. (B) Alignment of AtLTPG2 with MiLTPG2. The single and double underlines are indicating the signal peptide domain and the GPI transmembrane domain, respectively. The conserved Cys residues are highlighted in grey color.

**MiLTPG2 expression and cuticle accumulation**

We evaluated the MiLTPG2 gene expression by real time-quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) during mango fruit ontogeny. The DNA fragment sequence is the expected nucleotide compositions of the MiLTPG2

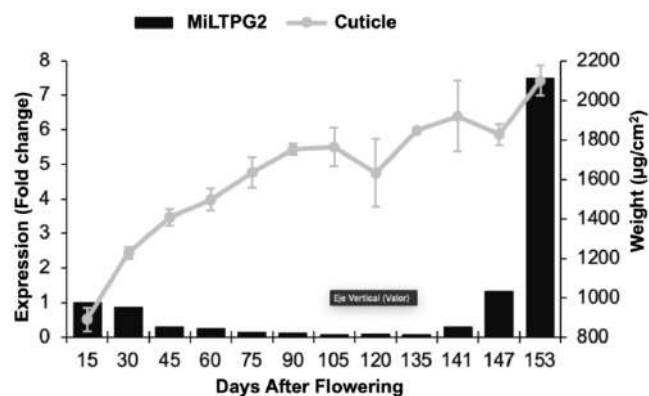
amplicon. Further, the qRT-PCR products showed the predicted sizes after separation by agarose gels electrophoresis (Figure 2). The relative expression of MiLTPG2 from 30 to 140 DAF was less a 1-fold change as compared with 15 DAF. Then, showed a slight increase in 1.31-fold change at 147 DAF, and finally, MiLTPG2 expression showed a high increase of 7.48-fold change at 153 DAF as compared with 15 DAF.



**Figure 2.** Real time quantitative reverse transcription PCR analysis of MiLTPG2 transcripts in mango fruit peel. Agarose gel electrophoresis of the PCR amplified products. Lane 1: 50 bp DNA ladder, lane 2 MiLTPG2 (size band: 115 bp), and lane 3: MiActin1 (size band: 141 bp).

The initial cuticular weight at 15 DAF was 889  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and continued increasing until 105 DAF reaching 1763  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Figure 3). Thereafter, it showed a decrease to 1632  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  at 120 DAF. After that, cuticular weight showed an increase of 1846 and 1920  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  from 135 to 141 DAF, respectively. Moreover, a slight decrease to 1827  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  was recorded at 147 DAF. Finally, the cuticle accumulation showed a large increase by the end of the storage time to reach 2100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  at 153 DAF, which is the maximum cuticular weight registered during mango fruit ontogeny (Figure 3). The cuticle accumulation follows a continuous pattern during fruit development, including a large accumulation during fruit growth followed by the second phase of maximal cuticle deposition during ripening. These cuticle accumulation patterns agree well with previously reported data by Petit-Jiménez *et al.*, (2007) for the same mango cultivar. However, in this last experiment, the maximum cuticular weight was 1609  $\mu\text{g}$  recorded at 135 days post anthesis (DPA). Many studies had been reported that the cuticle biosynthesis is influenced by genetics, physiological, environmental factors and postharvest handling (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013), which can explain the differences in both studies.

The MiLTPG2 expression profile showed low expression during the early stages of development (15-60 DAF), almost undetectable levels of expression in intermediates stages of development (75-135 DAF) and a high expression during 141-147 DAF (Figure 3). Furthermore, the maximum expression level was recorded during the ripening and storage time (153 DAF), which is the developmental stage in which it is taking a place a major cuticle accumulation.



**Figure 3.** Profile expression of MiLTPG2 and cuticle accumulation during mango fruit ontogeny. Regulation of the MiLTPG2 gene expression is shown in bars and the line included is indicating the cuticle accumulation during mango fruit ontogeny.

In general, the MiLTPG2 gene expression does not correlate with cuticle accumulation during mango fruit ontogeny, exception at initial (15 DAF) and final stages (153 DAF). However, it was reported that LTPG2 is functionally overlapped with LTPG/LTPG1 during cuticular wax export (Kim *et al.*, 2012). Because of this, further experimental evidences are needed to prove that the MiLTPG2 gene studied in this work plays a role in transporting the alkane  $\text{C}_{29}$  likewise its homolog gene AtLTPG2 from Arabidopsis.

## CONCLUSIONS

The MiLTPG2 gene contain the three different domains characteristic of the LTPG proteins: a signal peptide domain, a lipid transfer domain and a transmembrane domain, similar to AtLTPG2. The analysis of MiLTPG2 gene expression provides the first insight to understand the putative role of this gene in wax transport during cuticle biosynthesis in mango fruit. Further studies are required to confirm the role of MiLTPG2 in cuticle biosynthesis.

## REFERENCES

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Borner GH, Sherrier DJ, Stevens TJ, Arkin IT, Dupree P. 2002. Prediction of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Proteins in Arabidopsis. *A Genomic Analysis. Plant Physiol.* 129, 486 LP-499. doi:10.1104/pp.010884
- Cameron KD, Teece MA, Smart LB. 2006. Increased Accumulation of Cuticular Wax and Expression of Lipid Transfer Protein in Response to Periodic Drying Events in Leaves of Tree Tobacco. *Plant Physiol.* 140, 176–183. doi:10.1104/pp.105.069724

- DeBono A, Yeats TH, Rose JKC, Bird D, Jetter R, Kunst L, Samuels L. 2009. ArabidopsisLTPG Is a Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Required for Export of Lipids to the Plant Surface. *Plant Cell* 21, 1230-1238. doi:10.1105/tpc.108.064451
- Edstam MM, Blomqvist K, Eklöf A, Wennergren U, Edqvist J. 2013. Coexpression patterns indicate that GPI-anchored non-specific lipid transfer proteins are involved in accumulation of cuticular wax, suberin and sporopollenin. *Plant Mol. Biol.* 83, 625–649.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server BT - The Proteomics Protocols Handbook, in: Walker, J.M. (Ed.) Humana Press, Totowa, NJ, pp. 571–607. doi:10.1385/1-59259-890-0:571
- Kader JC. 1996. Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 627–654. doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.627
- Kim H, Lee SB, Kim HJ, Min MK, Hwang I, Suh MC. 2012. Characterization of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein 2 (LTPG2) and Overlapping Function between LTPG/LTPG1 and LTPG2 in Cuticular Wax Export or Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 53, 1391–1403. doi:10.1093/pcp/pcs083
- Kunst L, Samuels AL. 2003. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. *Prog. Lipid Res.* 42, 51–80. doi: https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00045-0
- Lee SB, Go YS, Bae HJ, Park JH, Cho SH, Cho HJ, Lee DS, Park OK, Hwang I, Suh MC. 2009. Disruption of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Lipid Transfer Protein Gene Altered Cuticular Lipid Composition, Increased Plastoglobules, and Enhanced Susceptibility to Infection by the Fungal Pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol.* 150, 42 LP-54. doi:10.1104/pp.109.137745
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Luo C, He XH, Chen H, Hu Y, Ou SJ. 2013. Molecular cloning and expression analysis of four actin genes (MiACT) from mango. *Biol. Plant.* 57, 238–244. doi:10.1007/s10535-012-0278-9
- Martin LBB, Rose JKC. 2014. There's more than one way to skin a fruit: formation and functions of fruit cuticles. *J. Exp. Bot.* 65, 4639–4651.
- Mintz-Oron S, Mandel T, Rogachev I, Feldberg L, Lotan O, Yativ M, Wang Z, Jetter R, Venger I, Adato A, Aharoni A. 2008. Gene Expression and Metabolism in Tomato Fruit Surface Tissues. *Plant Physiol.* 147, 823 LP-851. doi:10.1104/pp.108.116004
- Petit-Jiménez D, González-León A, González-Aguilar G, Sotelo-Mundo R, Báez-Sañudo R. (2007) Cambios de la cutícula durante la ontogenia del fruto de *Mangifera indica* L. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(1):51-60.
- Pierleoni A, Martelli PL, Casadio R. 2008. PredGPI: a GPI-anchor predictor. *BMC Bioinformatics* 9, 392. doi:10.1186/1471-2105-9-392
- Pighin JA, Zheng H, Balakshin LJ, Goodman IP, Western TL, Jetter R, Kunst L, Samuels AL. 2004. Plant Cuticular Lipid Export Requires an ABC Transporter. *Science* (80). 306, 702 -704. doi:10.1126/science.1102331
- Pyee J, Yu HS, Kolattukudy PE. 1994. Identification of a Lipid Transfer Protein as the Major Protein in the Surface Wax of Broccoli (*Brassica oleracea*) Leaves. *Arch. Biochem. Biophys.* 311, 460–468. doi:https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1263
- Riederer M, Schreiber L. 2001. Protecting against water loss: analysis of the barrier properties of plant cuticles. *J. Exp. Bot.* 52, 2023–2032.
- Shen HB, Chou KC. 2007. Signal-3L: A 3-layer approach for predicting signal peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 297–303. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.140
- Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Van Kammen A, De Vries SC. 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3, 907 LP-921. doi:10.1105/tpc.3.9.907
- Tafolla-Arellano JC, Báez-Sañudo R, Tiznado-Hernández ME. 2018. The cuticle as a key factor in the quality of horticultural crops. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 232, 145–152. doi:https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.01.005
- Tafolla-Arellano JC, González-León A, Tiznado-Hernández ME, García LZ, Báez-Sañudo R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en Plantas. *Rev. Fitotec. Mex.* 36, 3–12.
- Tafolla-Arellano JC, Zheng Y, Sun H, Jiao C, Ruiz-May E, Hernández-Oñate MA, González-León A, Báez-Sañudo R, Fei Z, Domozych D, Rose JKC, Tiznado-Hernández ME. 2017. Transcriptome Analysis of Mango (*Mangifera indica* L.) Fruit Epidermal Peel to Identify Putative Cuticle-Associated Genes. *Nat. Publ. Gr.* doi:10.1038/srep46163
- Thornton B, Basu C. 2011. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 39, 145–154. doi:10.1002/bmb.20461
- Wan CY, Wilkins TA. 1994. A Modified Hot Borate Method Significantly Enhances the Yield of High-Quality RNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal. Biochem.* 223, 7–12. doi:https://doi.org/10.1006/abio.1994.1538
- Yeats TH, Howe KJ, Matas AJ, Buda GJ, Thannhauser TW, Rose JKC. 2010. Mining the surface proteome of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit for proteins associated with cuticle biogenesis. *J. Exp. Bot.* 61, 3759–3771. doi:10.1093/jxb/erq194
- Yeats TH, Rose JKC. 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* 17, 191–198. doi:10.1110/ps.073300108
- Zhang YZ, Shen HB. 2017. Signal-3L 2.0: A Hierarchical Mixture Model for Enhancing Protein Signal Peptide Prediction by Incorporating Residue-Domain Cross-Level Features. *J. Chem. Inf. Model.* 57, 988–999. doi:10.1021/acs.jcim.6b00484.



## Influencia de la aireación forzada y la densidad de empaque sobre la producción de elagitanasa por fermentación en estado sólido

### Influence of forced aeration and packing density on the ellagitannase production by solid-state fermentation

Díaz-Herrera, R.<sup>1</sup>, Aguilar-Zarate, P.<sup>1</sup>, Buenrostro-Figueroa, J.J.<sup>2</sup>, Prado-Barragán, A.<sup>2</sup>, Ascacio, J.A.<sup>1</sup> y Aguilar C.N.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Grupo de Bioprocesos. Departamento de Investigación en Alimentos. Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Saltillo, Coahuila, México.

<sup>2</sup>Planta Piloto de Fermentaciones. Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D.F.

\*E-mail: [crisobal.aguilar@uadec.edu.mx](mailto:crisobal.aguilar@uadec.edu.mx)

Recibido: 21 de septiembre 2019

Aceptado: 28 de enero 2020

#### Resumen

La formación de ácido elágico (AE) por fermentación en estado sólido (FES) es catalizada por la enzima elagitanasa o elagitanin-acil hidrolasa (EAH), la cual es producida por el hongo *Aspergillus niger*, cuya producción puede ser afectada por la selección y variación de factores en la FES. Por lo anterior, en el presente trabajo se evaluó el efecto producido por diferentes volúmenes de aireación forzada (0, 6 y 12 mL/min) y diferentes niveles de densidad de empaque (0.05, 0.06 y 0.08 g/cm<sup>3</sup>) en reactores en columna, midiendo como variable de respuesta la producción de enzima y la liberación de AE con el objetivo de establecer el comportamiento y definir las condiciones de máxima producción de enzima, liberación de producto, consumo de sustrato y crecimiento de biomasa. Se utilizaron como fuente de carbono elagitaninos (ETs) de cáscara de granada. La aireación tuvo un mayor efecto en la respuesta del proceso que la densidad de empaque. La mayor cantidad de enzima y AE se alcanzó a las 30 h (170.06 U/L y 10.9 mg/L respectivamente), demostrando que el suministro de oxígeno juega un papel importante en el crecimiento del microorganismo y en la biosíntesis de enzima requerida para la producción del agente bioactivo de interés, el AE.

**Palabras clave:** Ácido elágico, elagitanasa, fermentación en estado sólido, aireación, densidad de empaque.

#### Abstract

Ellagic acid (EA) formation by solid-state fermentation (SSF) is catalyzed by the enzyme ellagitannase or ellagitanin-acyl hydrolase (EAH), which is produced by the fungus *Aspergillus niger*, whose production can be affected by the selection and factor variation in the FES. Therefore, the effect of different volumes of forced aeration (0, 6 and 12 mL/min) and different packing density levels (0.05, 0.06 and 0.08 g/cm<sup>3</sup>) in column reactors was evaluated, measuring the enzyme production and AE release as response variables, with the aim of establishing the behavior and defining the conditions of maximum enzyme production, product release, substrate consumption and biomass growth. Pomegranate peel ellagitanins (ETs) were used as carbon source. Aeration showed a greater effect on the process response than packing density. The highest amount of enzyme and AE was reached at 30 h of fermentation (170.06 U/L and 10.9 mg/L respectively), demonstrating that the oxygen supply plays an important role in the growth of microorganism and the enzyme biosynthesis required for the production of the bioactive agent of interest, the EA.

**Keywords:** Ellagic acid, ellagitannase, solid-state fermentation, aeration, packing density.

## INTRODUCCIÓN

El AE es una lactona que deriva de moléculas de ácido gálico y se sabe que es el residuo de la hidrólisis de ETs (Ascacio-Valdés *et al.*, 2010). En los últimos años, el AE ha despertado un interés comercial debido a sus aplicaciones y propiedades, principalmente enfocadas a la salud humana. (Sepúlveda *et al.*, 2011), ya que es un compuesto de alto valor utilizado en industrias tales como alimentarias, cosméticas y farmacéuticas, debido a que puede ser utilizado por sus propiedades como antioxidante, antitumoral, antiviral, antimicrobiana y anticancerígena (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). Para que la reacción sea específica y de los ETs se pueda producir AE, se requiere la acción sinérgica de una enzima capaz de romper los enlaces químicos en los ETs monoméricos (Huang *et al.*, 2008), como la EAH. Se cree que esta enzima de reciente descubrimiento es la responsable de catalizar la hidrólisis del grupo hexa-hidroxi difenico (HHDP) de los ETs, un intermediario para la liberación de AE. Por lo cual es necesario que se continúe con las investigaciones que ayuden a entender de manera clara cuál es la ruta de biodegradación de los ETs (Ascacio-Valdés, 2012; Sepúlveda *et al.*, 2016).

El monitoreo y control de varios parámetros durante la fermentación son de gran importancia para lograr una alta productividad (Pandey, 2003) durante el proceso de fermentación, ya que se puede desprender una gran cantidad de calor y con el progreso de la fermentación, se produce la contracción del lecho fermentado y la porosidad disminuye, lo cual obstaculiza más la transferencia de calor. La densidad de empaque del medio puede limitar el proceso de la fermentación, dificultando la transferencia de masa y calor (Costa *et al.*, 1998). La aireación tiene una gran importancia en la FES debido a la demanda de oxígeno en el proceso aeróbico y a los fenómenos de transporte de masa y de calor en el sistema (De la Cruz-Quiroz, 2012). La aireación del medio sólido humedecido es un factor crítico relacionado con la productividad, ya que no sólo provee oxígeno al sistema sino que también remueve el dióxido de carbono, otros metabolitos volátiles y el calor del fermentador (Lonsane *et al.*, 1992; Saucedo-Castañeda & Trejo-Hernández, 1994)

Con la relevancia científica que ha adquirido el AE, es necesario optimizar el proceso de producción y recuperación de esta molécula, por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de aireación forzada y la densidad de empaque sobre la producción de AE en FES con *Aspergillus niger* GH1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismo.** Se utilizó la cepa *Aspergillus niger* GH1 de la colección de microorganismos del Departamento de

Investigación en Alimentos (DIA) de la Universidad Autónoma de Coahuila. La cepa se activó en matraces con medio PDA durante 120 h, a 30 °C, se preparó una suspensión de esporas a 50 mL de una solución Tween 80 al 0.1 % y se contó el número de esporas en la cámara de Neubauer.

**Sustrato.** Se trabajó con polifenoles totales de granada (PTG), los cuales fueron proporcionados por el Departamento de Investigación en Alimentos (DIA), la purificación se llevó a cabo por el método propuesto por Ascacio-Valdés *et al.* en 2013. Las fracciones polifenólicas se sometieron a una separación utilizando cromatografía de alta resolución en escala preparativa en un equipo de cromatografía líquida (Varian ProStar 3300, Varian, USA) equipado con una columna Dynamax, Microsorb 300 C18 (250 mm x 21.4 mm, 10 µm), se utilizó un flujo de 5 mL/min y las condiciones fueron: como fase móvil: A) CH<sub>3</sub>COOH (3 % v/v en agua) y B) acetonitrilo. Después se dejó evaporar el solvente durante 24 h a 50 °C, se recuperaron los polifenoles en forma de polvo y se almacenaron en frascos ámbar para protegerlos de la luz.

Las fracciones obtenidas se sometieron a un análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) escala analítica acoplado a masas para la cuantificación de ETs obtenidos del proceso de extracción de los PTG. Para lo cual las muestras previamente filtradas (membrana 0.45 µm) se sometieron al análisis en un equipo ProStar 3300, Varian, USA, con una columna analítica Grace Denali C18 (250 mm x 4.6 mm, 5µ), con un flujo de 1.4 mL/min utilizando como solventes CH<sub>3</sub>COOH (3%) y acetonitrilo.

**Fermentación en estado sólido.** La fermentación se llevó a cabo con la metodología propuesta por Buenrostro-Figueroa *et al.* (2014), utilizando espuma de poliuretano como soporte inerte. La espuma se redujo a un tamaño de partícula de 0.250–1.19 mm en un molino Pulvex®, se lavó varias veces, se dejó secar a 60 °C por 2 d. Los reactores que se utilizaron fueron columnas de 2.25 x 18 cm, la espuma de poliuretano se impregnó a un 70 % de humedad, es decir, 6 g de PUF húmedo en cada reactor (1.8 g de PUF seco más 4.2 mL de medio con ETs), se prepararon 59.5 mL de medio de cultivo el cual contenía: 38.5 mL de medio de cultivo Czapek-Dox modificado por De la Cruz en el 2012 (elagitaninos: 7.5 g/L, nitrato de sodio: 3 g/L, fosfato de potasio dibásico: 1 g/L, sulfato de magnesio: 0.5 g/L, cloruro de potasio: 0.5 g/L), 20 mL de ETs (0.44 g) y 1 mL de suspensión de esporas con una concentración de  $2 \times 10^7$  esporas/g de espuma, se homogeneizó la mezcla y se empacó en los reactores. La fermentación se realizó a una temperatura de 30 °C por 18 h (De la Cruz-Quiroz, 2012). Una vez finalizada para obtener los extractos enzimáticos a las muestras se les añadió 10 mL de búfer de citratos 50 mM (pH 5) se homogeneizó y se filtró

por medio de jeringas estériles con algodón y papel filtro, los extractos filtrados se utilizaron para las determinaciones analíticas deseadas.

Los resultados de la fermentación fueron evaluados a las mejores condiciones de aireación y densidad de empaque determinadas previamente. La fermentación se realizó como fue descrito en el apartado anterior, se realizó una cinética en la que se tomaron muestras cada 6 h en un periodo de 36 h a 30 °C por duplicado, posteriormente se analizó biomasa, consumo de sustrato, actividad elagitanasa y producción de AE.

**Ensayo de actividad elagitanasa.** Para evaluar la actividad enzimática se utilizó como sustrato ETs de cáscara de granada. Se usó un control compuesto por 1 mL de solución amortiguadora de citratos y 50 µL de extracto enzimático. La mezcla de reacción contenía 1 mL de ETs (1 mg/mL) más 50 µL de extracto enzimático. La reacción se realizó a 60 °C en baño de agua durante 10 minutos, finalizado el tiempo de reacción, se agregaron 1.5 mL de etanol absoluto para detener la reacción. Las muestras se sonicaron por 25 minutos, se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm de diámetro y se almacenaron en viales para la cuantificación de AE.

La cuantificación de AE se llevó a cabo por HPLC (Varian ProStar System) con un detector de matriz (PDA ProStar) a 254 nm, de acuerdo con Ascacio-Valdés *et al.* (2013), bajo las siguientes condiciones: una columna Optisil ODS (5µm, 250 x 4.6 mm), flujo de 1 (mL/min), y un volumen de muestra de 10 mL, en columna por 40 minutos, con una fase móvil que consistió en metanol, acetonitrilo y ácido acético al 3%, se preparó una solución de AE para la curva de calibración. Una unidad elagitanasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 µmol de AE por minuto por mL de extracto enzimático bajo las condiciones descritas.

**Determinaciones analíticas.** El consumo de sustrato se midió por HPLC en un equipo marca Varian®, para determinar la cantidad de sustrato (punicalina) presente en cada muestra (KUA) a lo largo de las 36 h de fermentación.

La biomasa se determinó por el método indirecto de glucosamina. Las muestras fueron hidrolizadas para liberar la glucosamina de la pared celular; el compuesto pirrol formado cuando es combinado con acetilacetona reacciona con p-dimetilaminobenzaldehído, formando un compuesto rojo. Se llevó a cabo una curva de calibración de glucosamina bajo las mismas condiciones experimentales usadas para las muestras. La glucosamina asociada al crecimiento microbiano se determinó para obtener el contenido de biomasa (mg/g) de muestra (Medina-Morales *et al.*, 2012).

**Diseño experimental y análisis estadístico.** Se evaluó el efecto de la aireación y la densidad de empaque a tiempo final y se evaluó con un diseño experimental completamente al azar 3x3, los tratamientos se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Diseño utilizado para la evaluación de la aireación y la densidad de empaque en la producción de AE

Tratamiento	Flujo de aire (mL/min)	Altura de la cama (mm)	Densidad de empaque (g/cm <sup>3</sup> )
1	0	58	0.08
2	0	76	0.06
3	0	90	0.05
4	6	58	0.08
5	6	76	0.06
6	6	90	0.05
7	12	58	0.08
8	12	76	0.06
9	12	90	0.05

El flujo de aire fue controlado mediante válvulas y los diferentes niveles de densidad de empaque se alcanzaron comprimiendo el material inoculado a varias alturas, los resultados fueron analizados en el programa STATISTICA 7.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

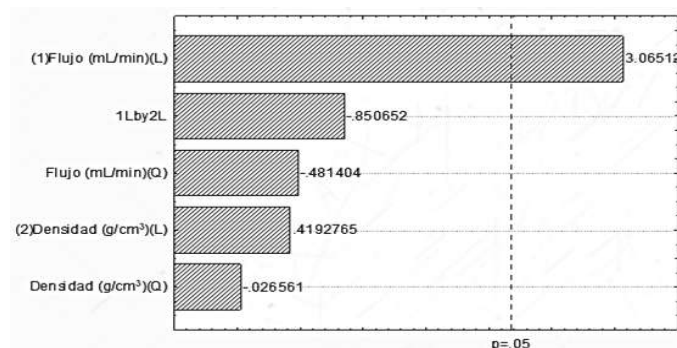
Los resultados de los nueve tratamientos para la producción de la enzima y la liberación de AE en reactores en columna se muestran en la Tabla 2, donde se obtuvo tanto la mayor actividad enzimática como la mayor acumulación de AE en el tratamiento 9 (flujo de aire de 12 mL/min y densidad de empaque de 0.05 g/cm<sup>3</sup>), mostrando un valor de 259.7 U/L de la enzima y 9.7 mg/L de AE.

**Tabla 2.** Resultados de la fermentación a las 18 h para los 9 tratamientos evaluando la producción de enzima EAH y la liberación de AE.

TRATAMIENTOS	EAH (U/L)	AE (mg/L)
1	244.3±0.45	9.42±0.11
2	236.7±1.50	9.20±0.06
3	237.81±0.20	9.60±0.83
4	244.61±0.10	9.20±0.13
5	251.8±0.30	9.15±0.06
6	240±1.00	9.13±0.04
7	255.3±0.50	9.34±0.01
8	252.1±0.52	9.34±0.24
9	259.8±0.10	9.70±1.02

Por lo anterior, se realizó un análisis estadístico para determinar si los factores de aireación y densidad de empaque tienen algún efecto sobre la producción de la enzima EAH. En la Figura 1 se muestra un diagrama de Pareto donde se muestra el efecto de los factores evaluados y su interacción, y se observa que sólo la aireación en valores altos tuvo un efecto

significativo por encima de la densidad de empaque y su interacción.

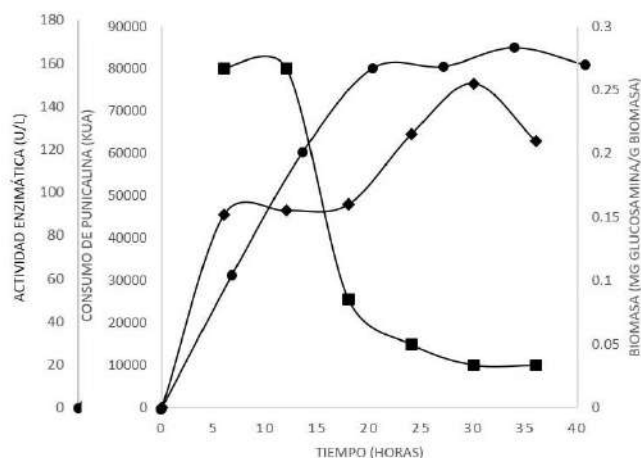


**Fig. 1.** Interacción de los factores sobre la producción de EAH

Sin embargo, el análisis de varianza realizado ( $p < 0.05$ ) para evaluar los factores para la liberación de ácido elálgico evidenció que ningún factor ni su interacción influyen sobre su acumulación, lo cual indica que la cantidad de AE liberada no está directamente relacionada con la cantidad de enzima producida, esto puede ser debido a la heterogeneidad del medio de cultivo en la fermentación.

Con base en estos resultados obtenidos, en la Figura 2 se observan los resultados de la cinética que se realizó durante 36 h tomando muestra cada 6 h para monitorear el comportamiento de la enzima, el consumo de sustrato y la producción de biomasa utilizando la mayor cantidad de flujo de aire de 12 mL/min y el valor más bajo de densidad de empaque ( $0.05 \text{ g/cm}^3$ ), esto para favorecer el transporte de oxígeno y el crecimiento del microorganismo. En la producción de la enzima elagitanasa y la liberación de AE, el mayor efecto se debe a la aireación de la fermentación. También se encontró que de todos los tratamientos, uno presentó los mejores resultados (tratamiento 9), con un flujo de aireación de 12 mL/min y una densidad de empaque de  $0.05 \text{ g/cm}^3$ , posiblemente debido a que fue de los tratamientos con mayor aireación en el sistema, teniendo similitud en los resultados con los demás tratamientos, sugiriendo que la aireación es un factor importante para la producción de enzima y AE.

Los resultados de la cinética mostraron una caída en la producción de enzima casi del 35 % en relación con los valores obtenidos en la primera fermentación donde el valor máximo de enzima fue de 259.7 U/L a las 18 h, cuando en la cinética el valor máximo es de 170.06 U/L. Esto puede ser debido a factores como la temperatura, el ambiente, la presión, entre otros.



**Fig. 2.** Cinética de producción de enzima (●), biomasa (◆) y consumo de punicalina como sustrato (■) a 36 h de fermentación en estado sólido de *A. niger* GH1.

Sin embargo, los valores en los tratamientos son mayores a los reportados por Ascacio-Valdés en el 2013, donde reportan una máxima actividad elagitanasa de 200.04 U/L en FES a las 12 h de cultivo con *A. niger* GH1 y ETs de cáscara de granada como sustrato. Aguilera-Carbo *et al.* (2009) reportaron una producción de 44.5 U/L a las 36 h utilizando ETs de hoja de gobernadora como sustrato; tal producción es menor a lo obtenido en este estudio tanto en la primera como en la segunda fermentación.

En cuanto a la producción de AE se logró un aumento casi del 13% probablemente debido a la mejor interacción de la enzima con el sustrato en el medio con respecto a lo obtenido en la medición de los tratamientos donde se tenía un valor máximo de 9.68 mg/L y en la cinética se alcanzó un valor de 10.9 mg/L de extracto a las 30 h. Los resultados obtenidos son mayores a lo reportado por Robledo *et al.* (2008) donde reportaron 6.3 mg/g de AE a las 144 h de cultivo utilizando como sustrato polifenoles de granada con *A. niger* GH1 en FES. No obstante, el valor máximo de AE obtenido en este estudio (10.9 mg/L) es 3.85 veces menor al reportado por Ascacio-Valdés en el 2013 a las 12 h de cultivo, empleando un extracto parcialmente purificado de ETs de cáscara de granada.

Se observó un comportamiento similar tanto en la producción de enzima como de AE, observando un aumento a las 6 h y disminuyendo a las 12 h. Lo anterior se puede deber al comportamiento mostrado por el microorganismo en función del consumo de sustrato, el cual alcanza su máximo a las 10 h, ya que el primer compuesto en la fermentación es la punicalagina, el cual se cree se degrada a punicalina según la gráfica en un tiempo de entre las 6 y las 12 h. Por este motivo el crecimiento del microorganismo disminuye para las 12 h y vuelve a incrementar a las 18 h, mismo tiempo en que la punicalina empieza a funcionar como sustrato; por lo anterior,

el crecimiento del hongo se debe a la utilización de otros ETs presentes en el medio hasta poder utilizar la punicalina como sustrato. El máximo crecimiento (30 h) corresponde al valor más bajo de punicalina (0.25 mg/g), lo cual tiene relación con la máxima producción tanto de AE como de la enzima EAH.

## CONCLUSIÓN

Estos resultados indican que las condiciones establecidas presentan un buen rendimiento tanto para la producción de elagitanasa y ácido elágico como para el crecimiento del microorganismo, ya que solo el primer parámetro aumentó en función con la aireación forzada pero al ser un medio heterogéneo no se dio una buena interacción de la enzima con los Ets. Sin embargo, se debe seguir investigando para poder encontrar las mejores condiciones de cultivo, para así optimizar el proceso y mejorar el rendimiento, resultando así una alternativa viable para la producción de estos compuestos.

## Agradecimientos

El autor Díaz-Herrera agradece a la Universidad Autónoma de Coahuila en Saltillo y a la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa por el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

## Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

## REFERENCIAS

- Aguilera-Carbo, A., Hernández, J. S., Augur, C., Prado-Barragan, L. A., Favela-Torres, E. & Aguilar, C. N. (2009) 'Ellagic acid production from biodegradation of creosote bush ellagitannins by aspergillus niger in solid state culture', *Food and Bioprocess Technology*, 2(2): 208–212.
- Ascacio-Valdés, J. A. (2012) Tesis "*Estudio de la hidrólisis microbiana de los elagitaninos*". Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.
- Ascacio-Valdés, J. A., Buenrostro, J. J., De la Cruz, R., Sepúlveda, L., Aguilera, A. F., Prado, A., Contreras, J. C., Rodríguez, R. & Aguilar, C. N. (2013) 'Fungal biodegradation of pomegranate ellagitannins', *Journal of Basic Microbiology*, 54(1): 28–34.
- Ascacio-Valdés, J., Aguilera-Carbó, A., Martínez-Hernández, J. L., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar, C. N. (2010) 'Euphorbia antisiphilitica residues as a new source of ellagic acid', *Chemical Papers*, 64(4): 528–532.
- Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, A., Sepúlveda, L., De La Cruz, R., Prado-Barragán, A., Aguilar-González, M. A., Rodríguez, R. & Aguilar, C. N. (2014) 'Potential use of different agroindustrial by-products as supports for fungal ellagitannase production under solid-state fermentation', *Food and Bioprocess Technology*, 92(4): 376–382.
- Buenrostro-Figueroa, J., Huerta-Ochoa, S., Prado-Barragán, A., Ascacio-Valdés, J., Sepúlveda, L., Rodríguez, R., Aguilera-Carbó, A. & Aguilar, C. N. (2014) 'Continuous production of ellagic acid in a packed-bed reactor', *Process Biochemistry*, 49(10): 1595–1600.
- Costa, J. A. V., Alegre, R. M. & Hasan, S. D. M. (1998) 'Packing density and thermal conductivity determination for rice bran solid-state fermentation', *Biotechnology Techniques*, 12(10): 747–750.
- Huang, W., Niu, H., Li, Z., He, Y., Gong, W. & Gong, G. (2008) 'Optimization of ellagic acid production from ellagitannins by co-culture and correlation between its yield and activities of relevant enzymes', *Bioresource Technology*, 99(4): 769–775.
- De la Cruz-Quiroz, R. (2012) Tesis "*Optimización de las condiciones de producción de una elagitanasa fúngica*". Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, México.
- Lonsane, B., Saucedo-castañeda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra-gonzález, G., Ghildyal, N., Ramakrishna, M. & Krishnaiah, M. (1992) 'Scale-up strategies for solid-state fermentation', *Process Biochemistry*, 27: 259–273.
- Medina-Morales, M., Rojas-Molina, R., Rodríguez-Herrera, R. & Aguilar, C. N. (2012) 'Manual de Métodos de Laboratorio del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila. DIA-UAdeC.' 1: 11–13.
- Pandey, A. (2003) 'Solid-state fermentation', *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3): 81–84.
- Robledo, A., Aguilera-Carbó, A., Rodríguez, R., Martínez, J. L., Garza, Y. & Aguilar, C. N. (2008) 'Ellagic acid production by Aspergillus niger in solid state fermentation of pomegranate residues', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(6): 507–513.
- Saucedo-Castañeda, G. & Trejo-Hernández, M. R. (1994) 'On-line Automated Monitoring and Control Systems for CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> in Aerobic and Anaerobic Solid-state Fermentations', *Process Biochemistry*, 29: 13–24.
- Sepúlveda, L., Ascacio, A., Rodríguez-Herrera, R., Aguilera-Carbó, A. & Aguilar, C. N. (2011) 'Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes', *African Journal of Biotechnology*, 10(22): 4518–4523.
- Sepúlveda, L., De la Cruz, R., Buenrostro, J., Ascacio-valdés, J. A., Aguilera-carbó, A. F., Prado, A., Rodríguez-herrera, R. & Aguilar, C. N. (2016) 'Effect of different polyphenol sources on the efficiency of ellagic acid release by Aspergillus niger', *Revista Argentina de Microbiología*. Elsevier España, S.L.U., 48(1): 71–77.