

## Biodegradación Microbiana de Elagitaninos

<sup>1</sup>Reynaldo De la Cruz, <sup>3</sup>Antonio Aguilera-Carbó, <sup>2</sup>Arely Prado-Barragán,  
<sup>1</sup>Raul Rodríguez-Herrera, <sup>1</sup>Juan Contreras-Esquivel y <sup>1</sup>Cristóbal Aguilar\*

<sup>1</sup>*Departamento de Investigación en Alimentos, Universidad Autónoma de Coahuila,*

<sup>2</sup>*Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana,*

<sup>3</sup>*Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México* \*Correo electrónico: [crisobal.aguilar@uadec.edu.mx](mailto:crisobal.aguilar@uadec.edu.mx)

### RESUMEN

La biodegradación de los elagitaninos representa una atractiva alternativa biotecnológica para la producción de ácido elágico, uno de los compuestos bioactivos más potentes que se conocen y cuyo interés radica en sus propiedades anticancerígenas y antivirales. Comercialmente, la hidrólisis de los elagitaninos se ejecuta por vía química bajo condiciones extremas de reacción, por lo que la necesidad de un bioproceso eco-amigable de alto rendimiento es altamente deseable. El presente artículo de revisión tiene como objetivo dar una visión general de todos los aspectos importantes sobre la biodegradación de los elagitaninos, sus fuentes, las cepas degradadoras de los mismos, con especial énfasis en la descripción y análisis de las contribuciones más relevantes en el tema.

**Palabras clave:** Biodegradación de elagitaninos, compuestos bioactivos, ácido elágico.

### ABSTRACT

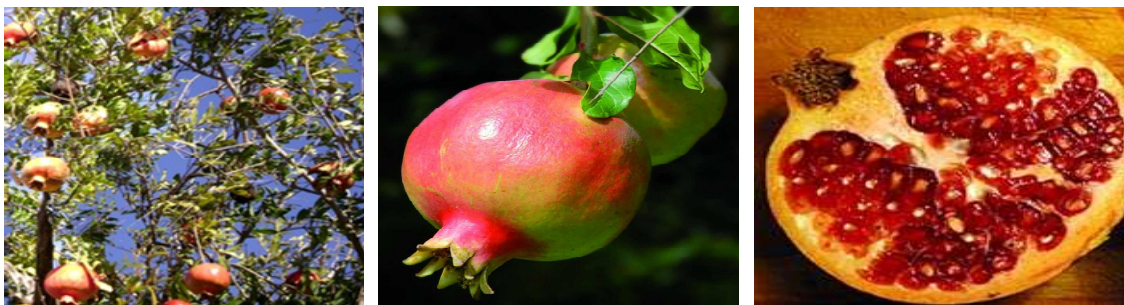
Ellagitannin biodegradation is an attractive alternative of biotechnological production of ellagic acid, an effective bioactive compound with anticarcinogenic and antiviral properties. Commercially the hydrolysis of ellagitannins is carried out by chemical way under extreme reaction conditions, by this reason is necessary to develop an environmental friendly process with high yield. The objective of this review is to present all important aspects respect to ellagitannins biodegradation, sources, ellagitannin-degrading strains, with emphasis on the description and analysis of relevant contribution in the topic.

**Key words:** Ellagitannins biodegradation, bioactive compounds, ellagic acid

## INTRODUCCIÓN

En la última década se han incrementado las investigaciones relacionadas a la recuperación de los polifenoles, en particular de los elagitaninos obtenidos de subproductos de la industria de los jugos, como la cáscara de granada (Fig 1) que contiene 18 % de estos compuestos según Aguilar *et al.* (2008) y Haidari *et al.* (2009). Este interés es resultado de investigaciones

sobre los efectos benéficos de los polifenoles para la salud humana. Entre los polifenoles más importantes se encuentra el ácido elágico, cuya aplicación ha sido significativamente incrementada debido a su uso en la industria de cosméticos y de alimentos para la elaboración de nutraceuticos (Huang *et al.*, 2007a; Ascacio-Valdés, 2009).



**Fig. 1.** (a) Arbusto de granada, (b) fruto de granada y (c) interior del fruto de granada.

Diversos estudios hacen referencia a la acción antioxidante de los polifenoles (Osawa & Walsh, 1993), así como también a la habilidad de inhibir y reducir varios tipos de cáncer como el del hígado (Varadkar *et al.*, 2001), padecimientos asociados a enfermedades cardiovasculares (Manach & Scalbert, 2005). Aguilera-Carbó *et al.*, (2008a) reportaron que los polifenoles también tienen propiedades que inhiben el crecimiento o multiplicación de bacterias, parásitos y virus, esta última actividad es muy relevante, sobre todo por la inhibición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) según lo demostrado por Ruibal (2003).

Las actividades mencionadas son basadas en un mecanismo de acción similar debido a que los polifenoles tienden a formar complejos estables e irreversible con las proteínas y con los polisacáridos (Carretero, 2000). Por tal motivo, el potencial farmacológico del ácido elágico le ha permitido ser considerado como uno de los compuestos bioactivos de mayor relevancia en la última década (Sociedad Americana de Cáncer, 2011).

A nivel comercial, el ácido elágico es producido por síntesis química, lo que implica la utilización de procesos químicos tradicionales donde emplean ácidos fuertes, grandes cantidades de solventes,

condiciones de proceso extremas, equipo sofisticado, y por lo tanto, tienden a ser demasiado costosos, además de la obtención de productos contaminados y bajos rendimientos (Aguilera-Carbó *et al.*, 2008a).

Con el fin de contribuir a la solución de este problema, en los últimos cinco años se ha pretendido usar enzimas producidas por microorganismos fúngicos, que funcionen como biocatalizadores de la degradación de los elagitaninos y liberen el ácido elágico para después recuperarlo, de esta manera se mejorará y se facilitará el proceso de obtención de este compuesto bioactivo, aumentando los rendimientos y calidad de las moléculas obtenidas (Huang *et al.*, 2007b; Aguilera-Carbó *et al.*, 2008b).

## **GENERALIDADES DE ELAGITANINOS Y ÁCIDO ELÁGICO**

Los taninos se clasifican en taninos complejos, taninos condensados, galotaninos y elagitaninos (Khanbabaee & Ree, 2001). Algunas plantas acumulan taninos, particularmente en hojas, corteza y tronco, esta acumulación de taninos protege a las partes vulnerables de la planta contra el ataque o inactivación por virus. Además los taninos inhiben el crecimiento de gran número de microorganismos resistiendo el ataque microbiano y siendo recalcitrantes a la biodegradación (Field & Lettinga, 1992).

En particular los elagitaninos corresponden a ésteres de ácido elágico y un poliol generalmente glucosa. Se forman a partir de los galotaninos por el acoplamiento oxidativo de al menos 2 unidades galoil,

originando el grupo ácido hexahidroxidifénico (HHDP). Mediante una hidrólisis en los elagitaninos se libera el grupo HHDP y este grupo según Aguilera-Carbó *et al.*, (2008b) sufre una lactonización espontánea para formar el ácido elágico.

El ácido elágico o ácido 4, 4',5, 5',6, 6'-hexahidroxidifénico 2, 6, 2', 6'-dilactona, es una molécula de peso molecular de 302.19 g/mol, su estructura química le confiere una alta estabilidad a la molécula, es termoestable, posee cuatro anillos, cuatro grupos fenólicos y dos lactonas, que pueden actuar como formadores de puentes de hidrógeno y aceptores de electrones, dándole así, una serie de cualidades y propiedades benéficas a la salud humana, como poder antioxidante, antimutagénico, antiviral, antibacterial, entre otras (Aguilera-Carbó *et al.*, 2008b).

Diversos estudios encaminados al descubrimiento de nuevos fármacos con propiedades benéficas a la salud humana apuestan por los compuestos polifenólicos como el ácido elágico, que son las nuevas moléculas que salen al mercado adicionadas a alimentos "plus" como zumos de frutas, bebidas y suplementos alimenticios.

## **FUENTES DE ELAGITANINOS**

La presencia de los elagitaninos y el ácido elágico ha sido determinada en diversos alimentos de origen vegetal, como por ejemplo el arándano, la frambuesa y la granada (Clifford & Scalbert, 2000; Vatterm & Shetty, 2003; Seeram *et al.*, 2005).

En trabajos recientes se ha evidenciado la presencia de los compuestos polifenólicos en especies vegetales pertenecientes al semidesierto mexicano, específicamente la gobernadora (*Larrea tridentata*), el hojásen (*Flourensia cernua*), la candelilla (*Euphorbia antisyphilitica*), la sangre de drago (*Jatropha dioica*) y la granada (*Punica granatum*) en sus diferentes etapas de maduración. Estos materiales vegetales se analizaron y se comparó el contenido de elagitaninos, los resultados arrojados mostraron que la granada contenía una mayor concentración de elagitaninos como equivalentes de ácido elágico con respecto a las demás fuentes (Aguilera-Carbó, 2009).

Las frutas de granada (*Punica granatum*) son principalmente consumidas frescas o procesadas en forma de jugos, mermeladas o vinos. La piel y la cáscara de la fruta de granada es una rica fuente de taninos hidrolizables llamados elagitaninos (ETs) que representan el 80-85% de los polifenoles totales en la cáscara (Seeram *et al.*, 2005). En la industria del jugo de granada comercial los elagitaninos son extraídos de la cáscara en cantidades significantes del jugo por sus propiedades hidrofílicas. La cáscara de granada es un subproducto de la industria de los jugos y es una fuente barata y abundante de ETs (Seeram *et al.*, 2005).

## RECUPERACIÓN DE ELAGITANINOS

Existen varios métodos para recuperar los elagitaninos de la granada, pero estos son muy laboriosos y consumen tiempos largos en extracciones en fase sólida por cromatografía en columna (C-18, poliamidas,

celulosa, Sephadex lipofílica LH-20, Diaion HP-20), así como el uso de instrumentos especializados como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Seeram *et al.*, 2005).

Se ha sugerido que los elagitaninos son susceptibles de hidrólisis con la ayuda de enzimas tanino-hidrolíticas que rompen los enlaces éster entre la glucosa y el grupo ácido hexahidroxidifénico (HHDP), liberando ácido elágico (AE), un compuesto más estable y con demostradas propiedades benéficas para la salud humana incluyendo efectos antivirales, antibacterianos, antioxidantes, etc. (Osawa & Walsh, 1993; Varadkar *et al.*, 2001; Ruibal 2003). Los elagitaninos son por naturaleza fitoquímicos asociados al sistema de defensa vegetal, por lo que el mecanismo de biodegradación es poco conocido y actualmente representa un reto científico-tecnológico debido principalmente a la complejidad y diversidad de este grupo de moléculas bioactivas.

## BIODAGRADACIÓN DE ELAGITANINOS

Los elagitaninos son compuestos polifenólicos que tienen un típico enlace C-C que los hace muy difíciles de degradar (Li *et al.*, 2006). Es por eso que en estos últimos años se están realizando grandes esfuerzos para mejorar la degradación y utilización de estos compuestos, trabajando con la propiedad que tienen algunos hongos de degradar los elagitaninos, lo que facilita la aplicación de enzimas degradadoras de elagitaninos para mejorar la producción industrial de ácido elágico (Aguilera-Carbó *et*

# Artículos

al., 2008b). En la Tabla 1 se muestra una lista con los microorganismos y fuentes

vegetales más usadas para la producción de ácido elálgico.

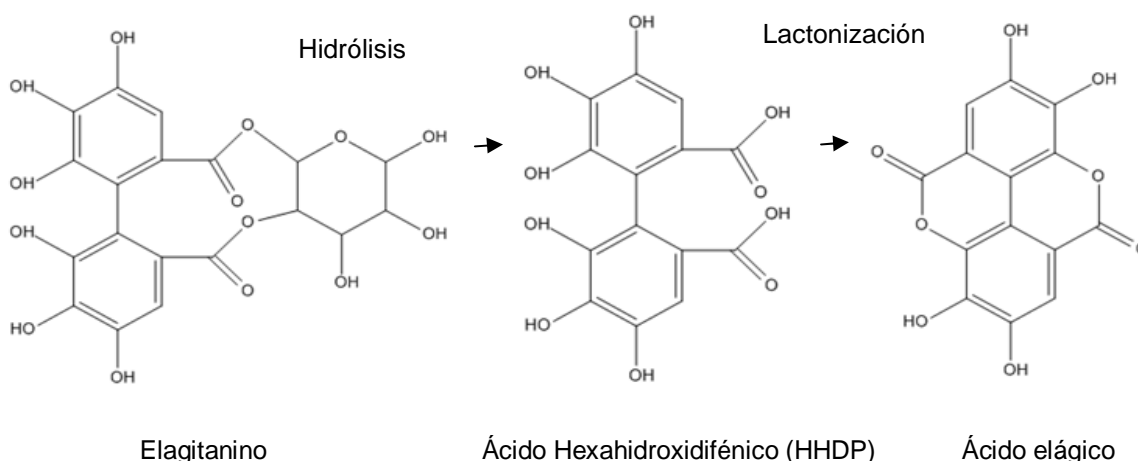
**Tabla 1.** Cepas fúngicas y fuentes vegetales más comunes para la producción de ácido elálgico.

Microorganismo	Fuente de elagitaninos	Referencias
<i>Lentinus edodes</i>	Pomaza de arándano	Vattem & Shetty 2003
<i>Rhizopus oligosporus</i>	Pomaza de arándano	Vattem & Shetty 2002
<i>Aspergillus niger/ Candida utilis</i>	Corteza de roble	Shi <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus niger</i> SHL 6	Corteza de roble	Huang <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus niger</i> GH1	Cáscara de granada	Robledo <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus oryzae</i>	Bellotas de roble	Huang <i>et al.</i> , 2007a
<i>Aspergillus oryzae</i>	Bellotas de roble	Huang <i>et al.</i> , 2007b
<i>Trichoderma reesei</i>		
<i>Aspergillus niger</i> PSH	Gobernadora y hojasén	Ventura <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus niger</i> GH1	Gobernadora	Aguilar <i>et al.</i> , 2007a

Fuente: Aguilera-Carbó *et al.*, 2008b

Los diferentes microorganismos mostrados en la Tabla anterior degradan los difíciles elagitaninos, debido a que secretan enzimas inducidas específicamente para romper los enlaces éster de los elagitaninos, liberando de este modo glucosa y el grupo

HHDP que de acuerdo con lo reportado por Aguilera-Carbó *et al.*, (2008b), este grupo sufre una lactonización espontánea para formar el ácido elálgico, un compuesto mucho más estable (Fig. 2).



**Fig. 2.** Hidrólisis de un elagitanino y lactonización del grupo HHDP.

De manera imprecisa, algunos investigadores adjudicaron que la liberación del ácido elágico estaba asociada a la acción de la  $\beta$ -glucosidasa y a la tanin acil hidrolasa (Vattem & Shetty, 2002 y 2003). También se ha reportado la acción de la valonia tanin-hidrolasa (Huang *et al.*, 2004) y de la elagitanin acil-hidrolasa o elagitanasa (Huang *et al.*, 2007a; Robledo *et al.*, 2008). Esta última fue descubierta en el departamento de investigación en alimentos (DIA) de la Universidad Autónoma de Coahuila, y se le atribuye la acción hidrolítica sobre los elagitaninos, siendo demostrado en un estudio donde se midió la actividad de todas estas enzimas, observando que la única que se relaciona con la acumulación de ácido elágico es la elagitanasa (Ascacio-Valdés *et al.*, 2011).

## ELAGITANIN ACIL HIDROLASA

La elagitanasa, o también llamada elagitanin acil hidrolasa, es una enzima que es inducida en grandes cantidades por síntesis en los microorganismos fúngicos (Sepúlveda-Torre *et al.*, 2009). La elagitanasa se encarga de hidrolizar los compuestos fenólicos conjugados como glucósidos u otras formas conjugadas, como son los elagitaninos (Vattem & Shetty, 2002). Esta conjugación reduce la habilidad para funcionar como un buen antioxidante, debido a la disponibilidad de grupos hidroxilo libres en los anillos fenólicos, que es potencialmente importante para la estabilización por resonancia de los radicales

libres (Vattem & Shetty, 2003). Para la producción biotecnológica del ácido elágico a partir de elagitaninos diversos se han utilizado diferentes géneros de hongos tales como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporum*, *Trichoderma reesei*, *Lentinus edodes*, *Candida utilis* como productores de elagitanasa (Vattem & Shetty, 2002; Vattem & Shetty, 2003; Huang *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007b; Robledo *et al.*, 2008).

La producción de la enzima elagitanasa depende de varios factores como la concentración de los elagitaninos, pH, temperatura, fuentes de carbono y nitrógeno, que son identificados como parámetros importantes de hidrólisis durante la fermentación (Huang *et al.*, 2004).

Las perspectivas próximas serán extraer cantidades suficientes de elagitaninos puros que permitan evaluar y seleccionar cepas capaces de degradarlos y emplearlos como sustrato, para que en estudios posteriores se logren producir en cantidades altas la enzima responsable de la liberación del ácido elágico y optimizar el proceso. La gran limitante de este tipo de trabajo es que las fermentaciones en estado sólido a gran escala son muy difíciles de manejar y para llegar a esa etapa primero es necesario tener en claro todos los factores de los que depende la fermentación en reactores pequeños. Solo así se podrá comenzar a trabajar en fermentaciones donde se usen grandes cantidades de sustrato para la producción de ácido elágico.



## REFERENCIAS

- Aguilera-Carbó A (2009) *Producción de ácido elálgico: estudios enzimáticos*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F. pp. 1-90
- Aguilera-Carbó A, Augur C, Prado-Barragán LA, CN Aguilar & Favela-Torres E (2008a) Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. *Chem. pap.* 62 4: 440-444.
- Aguilera-Carbó AF, Augur C, Prado-Barragán LA, Favela-Torres E & Aguilar CN (2008b) Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 78: 189-199.
- Aguilar CN, Rodríguez R, Gutiérrez-Sánchez G, Augur C, Favela-Torres E, Prado-Barragán LA, Ramírez-Coronel A & Contreras-Esquivel JC (2007) Microbial tannases: advances and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 76:47-59
- Aguilar CN, Aguilera-Carbó A, Robledo A, Ventura J, Belmares R, Martínez D, Rodríguez-Herrera R & Contreras JC (2008) Production of antioxidant nutraceuticals by solid-state cultures of pomegranate (*Punica granatum*) peel and creosote bush (*Larrea tridentata*) Leaves. *Food Technol. Biotechnol.* 46: 218-222.
- Ascacio-Valdés JA (2009) Aislamiento de elagitaninos *Euphorbia antisiphylitica* (candelilla). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Coahuila. pp 1-50.
- Ascacio-Valdés JA, Buenrostro-Figueroa JJ, Aguilera-Carbo A, Prado-Barragán A, Rodríguez-Herrera R & Aguilar CN (2011) Ellagitannins: biosynthesis, biodegradation and biological properties. *J. Med. Plants Res.* 5: 4698-4703.
- Carretero ME (2000) Compuestos fenólicos: Taninos. *Pan. Actual. Med.* 235: 633-636.
- Clifford MN & A Scalbert (2000) Review: Ellagitannins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1118-1125.
- Field JA & Lettinga G (1992) Toxicity of tannic compounds to microorganisms In: Hemingway RW Lanks E (Eds) *Plant Polyphenols: Synthesis, properties, Significance. Plenum Press, New York, USA.*
- Haidari M, Ali M, Casscells III SW & Madjid M (2009) Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extracts inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine.* 16: 1127-1136.
- Huang W, Niu H, Gong GH & Lu YR (2007a) Individual and combined effects of physicochemical parameters on ellagitannin acyl hydrolase and ellagic production from ellagitannin by *Aspergillus oryzae*. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 30:281-288.
- Huang H, Niu H, Li Z, Lin W, Gong G & Wang W (2007b) Effect of ellagitannin acyl hydrolase, xylanase and cellulase on the production of ellagic acid. *Proc. Biochem.* 22: 1291-1295.
- Huang W, Ni J & Borthwick A (2004) Biosynthesis of valonia tannin hydrolase

# Artículos

- and hydrolysis of valonia tannin to ellagic acid by *Aspergillus* SHL 6. *Proc. Biochem.* 40: 1245-1249.
- Khanbabaee K & van Ree T (2001) Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.* 18: 641-649.
- Li M, Kai Y, Qiang H & Dongying J (2006) Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J Basic Microbiol.* 46:68-84.
- Manach C & Scalbert A (2005) Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 727-747.
- Osawa R & Walsh TP (1993) Visual reading method for detection of bacterial tannase. *Appl Environ Microbiol.* 59: 1251-1252.
- Robledo A, Aguilera-Carbó A, Rodríguez R, Martínez JL, Garza Y & Aguilar CN (2008) Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 507-513.
- Ruibal JI (2003) Inhibición de la replicación del virus de inmunodeficiencia humana por extractos de taninos de *Pinus caribaea morelet*. *Rev. Cub. Farmacol.* 2: 37-41.
- Seeram N, Lee R, Hardy M & Heber D (2005) Rapid large scale purification of ellagitaninns from pomegranate husk a by-product of the commercial juice industry. *Sep. Purif. Technol.* 41: 49-55.
- Sepúlveda-Torre L, Hernández-Rivera JS, Ascacio-Valdés JA, Aguilera-Carbó A, Rodríguez-Herrera R & Aguilar-González CN (2009) Estudios de producción microbiana del antioxidante ácido elágico por cultivos en medio sólido. *Cienciacta.* 9: 9-12.
- Shi B, Qiang H, Kai Y, Huang W & Quin L (2005) Production of ellagic acid from degradation of valonea tannins by *Aspergillus niger* and *Candida utilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80:1154-1159
- Sociedad Americana de Cáncer. Disponible en: [www.cancer.org/](http://www.cancer.org/)
- Varadkar P, Dubey P, Krishna M & Verma NC (2001). Modulation of radiation-induced protein kinase C activity by phenolics. *J. Radiol. Protec.* 21: 361-370.
- Vattem D & Shetty K (2002) Solid state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotech.* 16: 189-210.
- Vattem D & Shetty K (2003) Ellagic acid production and phenolic antioxidant activity in cranberry pomace mediated by *Lentinus edodes* using solid-sate sistem. *Proc. Biochemi.* 39: 367-379.
- Ventura J, Belmares-Cerda R, Aguilera-Carbó A, Contreras-Esquivel JC, Rodríguez-Herrera R & Aguilar CN (2008) Fungal biodegradation of tannins from creosote bush (*Larrea tridentata* Cov.) and tar bush (*Flouencia cernua*) for gallic and ellagic acids production. *Food Technol. Biotechnol.* 46: 211-213.