



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EXTRACCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE COMPUESTOS
FENÓLICOS DE RUEZNO DE PISTACHE (*Pistacia vera* L.)**

Por:

ANDRES JAVIER ORDOÑEZ CANO

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS HORTOFRUTÍCOLAS Y
LACTEOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Andres Javier Ordoñez Cano, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



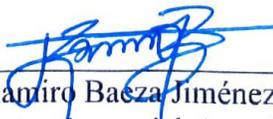
Dr. José Juan Buenrostro Figueroa
Director de Tesis



Dr. Leonardo Sepúlveda Torre
Co-director de Tesis



Dra. Sandra Mónica Alvarado González
Integrante de comité de tesis



Dr. Ramiro Baeza Jiménez
Integrante de comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Extracción Biotecnológica de Compuestos Fenólicos de Ruezno de Pistache (*Pistacia vera* L.)" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Andres Javier Ordoñez Cano, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Graciela Caire Juvera", is written over a horizontal line.

Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado para la realización del presente proyecto de investigación.

También al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., (CIAD) institución que me abrió las puertas para estudiar el posgrado en Maestría en Ciencias.

Agradezco a todos mis profesores que aportaron su conocimiento para poder aprender y me concedieron su amistad. Al Dr. José Juan Buenrostro Figueroa, a quién aprecio y fue mi director de tesis, quién me inculcó el apego a la investigación y siempre tuvo la disposición para explicarme e inspirarme a seguir sus pasos. Al Dr. Leonardo Sepúlveda Torre, por ser de ayuda siempre que se requirió, a pesar de encontrarse en otra institución. Al Dr. Ramiro Baeza Jiménez y la Dra. Sandra Mónica Alvarado González, quienes fueron integrantes del comité de tesis y siempre mostraron su disposición para ayudarme en temas académicos y personales. A los técnicos de laboratorio, el MC. Emilio Ochoa Reyes y la Dra. Hilda Karina Sáenz Hidalgo por su constancia, dedicación, y exigencia para formarme como profesionista. A la Dra. Celia Chávez Mendoza, Dr. Ezequiel Muñoz Márquez y Dr. Edwin Rojo Gutiérrez quienes formaron parte de mi formación académica y siempre estuvieron con la mayor disposición de explicarme y ayudarme.

A mis compañeros de generación, Rubí, Carlos y Raúl, a quienes considero amigos, donde vivimos buenos y malos momentos, pero siempre estuvimos el uno para el otro para darnos apoyo académico y emocional.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería, así como al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Subselección Delicias, por acogerme como un integrante, y proporcionarme los medios necesarios para realizar la parte experimental de la tesis.

Agradezco al grupo de trabajo al que pertencí, el grupo de Bioprocesos y Compuestos Bioactivos, donde todos mis compañeros fueron de gran ayuda, quienes me dieron su apoyo durante la presente investigación, en especial a Viviana.

DEDICATORIA

A mi familia que siempre me apoyó incondicionalmente en esta etapa de mi vida.

A mi pareja que siempre me alentó a seguir esforzándome y salir adelante.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	9
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1. Importancia del Pistache en la Sociedad.....	14
2.1.1. Ruezno de Pistache como Residuo Agroindustrial.....	16
2.1.2. Ruezno de Pistache como Fuente de Compuestos Fenólicos.....	17
2.1.2.1. Actividad antioxidante y antibacteriana del ruezno de pistache.....	20
2.2. Fermentación en Estado Sólido.....	22
2.2.1. Parámetros de Proceso en la Fermentación en Estado Sólido.....	23
2.2.1.1. Temperatura.....	23
2.2.1.2. Humedad.....	24
2.2.1.3. Sustrato.....	24
2.2.1.4. Tamaño de partícula.....	25
2.2.1.5. pH.....	25
2.2.1.6. Inóculo.....	25
2.2.1.7. Aireación.....	26
2.2.2. Elección de Microorganismos en Procesos de Fermentación en Estado Sólido...	27
2.2.2.1. Género <i>Aspergillus</i>	28
2.2.2.2. Modelos matemáticos para estimar el crecimiento microbiano.....	30
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo General.....	35
4.2. Objetivos Específicos.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Preparación del Ruezno de Pistache.....	36
5.2. Activación y Preparación de <i>Aspergillus niger</i> GH1.....	36
5.3. Etapa 1: Potencial del Ruezno de Pistache como Soporte en Fermentación en Estado Sólido y Selección de Tiempo de Fermentación.....	37

CONTENIDO (continuación)

5.3.1. Caracterización Fisicoquímica de Ruezno de Pistache.....	37
5.3.1.1. Índice de absorción de agua.....	37
5.3.1.2. Humedad máxima del ruezno de pistache.....	37
5.3.1.3. Punto crítico de humedad.....	38
5.3.1.4. Densidad de empaque.....	39
5.3.2. Cinética de Respiración.....	39
5.3.3. Preparación de Fermentación en Estado Sólido.....	40
5.3.4. Determinación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante.....	40
5.3.4.1. Fenoles hidrolizables.....	40
5.3.4.2. Fenoles condensados.....	41
5.3.4.3. Ensayo DPPH.....	41
5.3.4.4. Ensayo ABTS.....	41
5.3.4.5. Ensayo FRAP.....	42
5.3.5. Diseño Experimental.....	42
5.3.6. Análisis de Datos.....	43
5.4. Etapa 2: Efecto de la Fermentación en Estado Sólido con <i>A. niger</i> sobre la Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante a partir del Ruezno de Pistache.....	43
5.4.1. Diseño Experimental.....	43
5.4.2. Análisis de Datos.....	44
5.5. Etapa 3: Potencial Antibacteriano del Extracto de Ruezno de Pistache Fermentado....	44
5.5.1. Purificación y Caracterización del Extracto Fermentado.....	45
5.5.2. Actividad Antibacteriana.....	45
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1. Etapa 1: Potencial del Ruezno de Pistache como Soporte en Fermentación en Estado Sólido y Selección de Tiempo de Fermentación.....	47
6.1.1. Caracterización Fisicoquímica del Ruezno de Pistache.....	47
6.1.2. Cinética de Respiración.....	49
6.1.3. Determinación del Contenido Fenólico y Capacidad Antioxidante.....	52
6.2. Etapa 2: Efecto de la Fermentación en Estado Sólido con <i>A. niger</i> sobre la Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante a partir de Ruezno de Pistache.....	56
6.3. Etapa 3: Potencial Antibacteriano del Extracto de Ruezno de Pistache Fermentado....	64
6.3.1. Perfil de Compuestos Fenólicos.....	65
6.3.2. Potencial Antibacteriano.....	66
7. CONCLUSIONES.....	69
8. RECOMENDACIONES.....	70
9. REFERENCIAS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Árbol de pistache en producción.....	14
2 Fruto de pistache utilizado para comercio.....	15
3 Tipos de desechos agroindustriales.....	16
4 Partes del fruto de pistache.....	17
5 Estructuras de ácidos fenólicos.....	18
6 Estructuras de <i>A. niger</i>	29
7 Fases del crecimiento microbiano.....	32
8 Cinética de producción de CO ₂ ajustada al modelo Logístico como medición indirecta de crecimiento de <i>A. niger</i> GH1 en ruezno de pistache.....	49
9 Cinética de producción de CO ₂ ajustada al modelo Gompertz como medición indirecta de crecimiento de <i>A. niger</i> GH1 en ruezno de pistache.....	50
10 Efectos de contenido de humedad, concentración de inóculo y suministro de aireación sobre la liberación de fenoles totales.....	64

LISTA DE CUADROS

Cuadros	Página
1 Compuestos fenólicos presentes en ruezno de pistache.....	19
2 Estudios de actividad antioxidante del extracto de ruezno de pistache.....	20
3 Estudios de actividad antibacteriana del extracto de ruezno de pistache.....	21
4 Estudios de fermentación en estado sólido de residuos agroindustriales y especies vegetales poco valoradas empleando diferentes hongos.....	28
5 Enzimas extracelulares de las diferentes especies de <i>Aspergillus</i>	30
6 Matriz experimental Box-Behnken para evaluar el efecto de la concentración de inóculo, humedad y flujo de aire sobre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante del ruezno de pistache.....	43
7 Índice de absorción de agua, humedad máxima, punto crítico de humedad y densidad de empaque del ruezno de pistache.....	47
8 Datos obtenidos de la cinética de respiración ajustados a los modelos logístico y Gompertz.....	51
9 Determinación de contenido de fenoles hidrolizables, condensados y totales para cada tiempo de fermentación.....	52
10 Determinación de capacidad antioxidante del ruezno de pistache por los métodos DPPH, ABTS y FRAP para cada tiempo de fermentación.....	53
11 Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables de respuesta fenoles hidrolizables, fenoles condensados, fenoles totales, DPPH, ABTS y FRAP.....	54
12 Condiciones de humedad, concentración de inóculo y aireación para cada tratamiento.....	56
13 Determinación de contenido de fenoles hidrolizables, condensados y totales para cada tratamiento.....	57
14 Capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) en extractos de ruezno de pistache sometidos a fermentación en estado sólido con <i>A. niger</i> GH1.....	59
15 Efecto de la humedad, inóculo y aireación sobre el contenido de fenoles hidrolizables, condensados, totales y la capacidad antioxidante (DPPH, ABTS y FRAP) de extractos fermentados de ruezno de pistache.....	61
16 Perfil de compuestos fenólicos de ruezno de pistache purificado.....	65
17 Efectos del extracto acuoso y oleoso de ruezno de pistache en discos de 6 mm a diferentes concentraciones sobre <i>E.coli</i> , <i>Salmonella</i> sp. y <i>S. aureus</i>	66

RESUMEN

El pistache es consumido mundialmente por su valor nutrimental y los beneficios que aporta a la salud. Al cosechar el fruto, éste se divide en dos partes, una fracción comestible y otra no comestible que corresponde al ruezno (45 al 60 % del peso total del fruto), la cual es desechada. Se ha reportado la presencia de diversos compuestos bioactivos en el ruezno de pistache, como los compuestos fenólicos (CF). Estos compuestos se encuentran libres o ligados a componentes de pared celular, y son importantes debido a las propiedades biológicas que ejercen, como la actividad antioxidante y antibacteriana. Existen pocos estudios acerca del uso de este residuo, por lo cual es necesario diseñar estrategias para su aprovechamiento, ya que, por su composición y alto contenido de humedad, representa una serie de problemas ambientales. La fermentación en estado sólido (FES) es una técnica amigable con el medio ambiente, mediante la cual un microorganismo produce enzimas que facilitan la extracción de los CF. Con la FES aplicada al ruezno de pistache se busca maximizar la extracción de CF que, derivado de su actividad biológica, presenten potencial aplicación en el desarrollo de alimentos. El objetivo del presente trabajo fue obtener CF a partir del ruezno de pistache por medio de la FES con *Aspergillus niger*. Para ello, se evaluó el potencial del ruezno de pistache para ser empleado como soporte en un proceso de FES, se evaluó el efecto de la FES con *A. niger* sobre la liberación de CF, el potencial antibacteriano a partir del ruezno de pistache fermentado, así como su perfil de CF por HPLC-MS. El ruezno de pistache resultó ser un soporte apto para emplearse en FES ya que *A. niger* GH1 pudo crecer en él, presentando la mayor liberación de CF y capacidad antioxidante (CA) a las 24 h de proceso con 60% de humedad, una concentración de inóculo de 1×10^7 esp/mL y 1 VKgm de aireación, incrementando el contenido de CF un 129%. Este residuo contenía ácido gálico 4-O-glucósido y geranina, los cuales han sido reportados con actividad antioxidante y antibacteriana, demostrándose esta última contra *S. aureus* a una concentración de 1,500 $\mu\text{g/mL}$. Con esto se muestra el potencial antioxidante y antibacteriano que puede presentar el ruezno de pistache sometido a FES, generando una estrategia de aprovechamiento y darle un valor agregado a este residuo que no tiene ninguna utilidad en la actualidad.

Palabras claves: Ruezno de pistache, fermentación en estado sólido, *A. niger*, compuestos fenólicos.

ABSTRACT

Pistachio is consumed worldwide for its nutritional value and the health benefits it provides. When the fruit is harvested, it is divided into two parts, an edible fraction and another inedible fraction that corresponds to the green hull (45 to 60% of the total weight of the fruit), which is discarded. The presence of bioactive compounds has been reported in the pistachio green hull, such as phenolic compounds (FC). These compounds are free or bound to cell wall components and are important due to the biological properties that they exert, such as antioxidant and antibacterial activity. There are few studies about the use of this waste, and because of this is necessary to design strategies for its use, since, due to its composition and high moisture content, it represents a series of environmental problems. Solid-state fermentation (SSF) is an environmentally friendly technique, through which a microorganism produces enzymes that facilitate the extraction of FC. With the SSF applied to the pistachio green hull, it seeks to maximize the extraction of FC, that, derived from its biological activity, has potential application in the development of foods. The objective of the present work was to obtain FC from the pistachio green hull through SSF with *Aspergillus niger*. For this, the potential of pistachio green hull to be employed as a support in a SSF process, the effect of SSF with *A. niger* on the release of FC, the antibacterial potential from fermented pistachio green hull, was evaluated. The FC profile was obtained by HPLC-MS. The pistachio green hull is a suitable support to be used in SSF, due to *A. niger* GH1 was able to grow on it, presenting the highest release of FC and antioxidant capacity (AC) at 24 h of the process with 60% of moisture, an inoculum of 1×10^7 spores/mL and 1 VKgm of aeration, increasing the FC content by 129%. This residue contained gallic acid 4-O-glucoside and geranine, which have been reported to have antioxidant and antibacterial activity, the latter being demonstrated against *S. aureus* at a concentration of 1,500 $\mu\text{g/mL}$. This shows the antioxidant and antibacterial potential that the pistachio green hull subjected to SSF can present, generating a utilization strategy and giving added value to this waste that currently has no use.

Key words: Pistachio green hull, solid-state fermentation, *A. niger*, phenolic compounds.

1. INTRODUCCIÓN

El pistache (*Pistacia vera* L.) es uno de los principales frutos secos del mundo (Pakdaman *et al.*, 2021). El fruto del pistache es altamente consumido a nivel mundial, particularmente fresco o tostado (snack salado), en forma de aceite virgen vegetal y en forma de harina para la elaboración de pan, pasteles o galletas y como crema para untar (Mateos *et al.*, 2022). Para 2022, su producción mundial alcanzó las 829 mil toneladas, y los principales productores fueron Estados Unidos, Irán, Turquía y Siria (USDA, 2022).

El consumo de pistache se remonta a hace 300 mil años, ya que se han encontrado restos de pistache carbonizados en Israel (Mandalari *et al.*, 2021). En cuanto a su taxonomía, el pistache pertenece a la División Tracheophyta; Clase Magnoliopsida; Orden Sapindales; Familia Anacardiaceae; Género *Pistacia*; Especie *Pistacia vera* (GBIF Secretariat, 2021).

En México se producen por año cerca de 37 mil toneladas de pistache, de las cuales, el estado de Chihuahua aporta el 98.96 %, concentrando su producción en los municipios de Buenaventura, Juárez, Práxedes Guerrero, Jiménez, Aldama, Delicias y Meoqui (SENASICA, 2019; SIAP, 2019). El interés del pistache radica en el valor nutrimental que presenta, ya que la semilla contiene cerca del 50–60% de grasas, de las cuales cerca del 90% representa a grasas insaturadas, como el ácido oleico (grasa monoinsaturada) y ácido linoleico (grasa poliinsaturada), siendo este último el principal ácido graso en el fruto (Mateos *et al.*, 2022). Se conoce que los ácidos grasos monoinsaturados tienen un efecto vasodilatador, lo que ayuda a prevenir enfermedades del corazón al disminuir la presión arterial y aumentar la β -oxidación de ácidos grasos (Martínez-Ruiz *et al.*, 2019), mientras que los ácidos grasos poliinsaturados muestran acción antiinflamatoria (Cabo, Achón y González, 2015). El pistache contiene un 18-23% de proteína, 18% de carbohidratos (sobre todo sacarosa), mientras que el porcentaje restante corresponde a la fibra, minerales y compuestos bioactivos como carotenoides, clorofila y CF (Mandalari *et al.*, 2021; Martínez-Ruiz *et al.*, 2019; Olvera, 2022).

En cuanto a la producción del fruto del pistache, al ser cosechada se divide en dos partes, una fracción comestible, que es la que se comercializa, y una no comestible que es desechada. Esta última comprende entre el 45 y 60% del fruto total (Cardullo *et al.*, 2021; Elhadeif *et al.*, 2021; Hamed *et al.*, 2020), y no tiene un uso (Arjeh *et al.*, 2020). Diversos estudios han reportado al

ruezno de pistache como fuente potencial de compuestos bioactivos, los cuales presentan actividad antioxidante, antimicrobiana y antimutagénica (Cardullo *et al.*, 2021 y Neval-Özbek *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha reportado la capacidad de los microorganismos, como los hongos, para degradar residuos como semillas o cáscaras, por medio de FES. Este proceso libera CF e incrementa la CA en el extracto fermentado; lo que otorga un valor agregado a los residuos agroindustriales para el desarrollo de nuevos productos (Buenrostro *et al.*, 2017; Cano y Postigo *et al.*, 2021; Cerda *et al.*, 2023; Herrera, 2021; Torres *et al.*, 2019).

El estudio de estos CF presentes en el ruezno de pistache tendría un impacto en la industria farmacéutica y agrícola, encontrando un valor agregado a este residuo que no presenta alguna utilidad específica actualmente.

2. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del Pistache en la Sociedad

El pistache o pistacho (Figura 1) es un árbol nativo de regiones áridas del centro y oeste de Asia distribuido en el mediterráneo y Norteamérica (Elhadeh *et al.*, 2021). En México, el pistache ha sido poco explotado, ya que requiere de entre 5 a 10 años para iniciar su producción. Debido a ello, muchos agricultores prefieren otros árboles o cultivos que les regresen su inversión económica en periodos cortos de tiempo (Martínez-Ruíz *et al.*, 2019).



Figura 1. Árbol de pistache en producción.

Este árbol es una especie dioica (hembra y macho) que necesita una proporción de 8 hembras por cada macho en el plantío (De León *et al.*, 2020), además requiere condiciones climáticas que se traducen en inviernos fríos y veranos calurosos, observando que es muy importante cumplir con su demanda de horas frío (requiere acumular 900 horas por debajo de 7°C), para una efectiva producción de frutos (De Santiago *et al.*, 2022). La cosecha del fruto se da en el mes de agosto, y

el mayor rendimiento por hectárea es a partir del sexto año de producción (De León *et al.*, 2020). El pistache es uno de los más importantes frutos secos en el mundo (Figura 2) (Neval-Özbek *et al.*, 2018), y su importancia como alimento radica en su alto valor comercial, siendo utilizado para la repostería y elaboración helados, así como en formulación de cosméticos (Martínez-Ruíz *et al.*, 2019). En cuanto a su valor nutricional, el pistache es consumido mundialmente por los beneficios que otorga a la salud (Moreno *et al.*, 2022), donde destaca la actividad antidiabética, cardiovascular, antioxidante, antiinflamatoria, anticancerígena y antiobesogénica (Mateos *et al.*, 2022). Es una fuente rica en micronutrientes, ácidos grasos, proteínas y diversos compuestos antioxidantes como los CF y los carotenoides (De Santiago *et al.*, 2022).



Figura 2. Fruto de pistache utilizado para comercio.

Al cosechar, se obtiene el fruto con su cáscara dura y una cáscara verde-amarillenta que lo cubre, llamada ruezno. Derivado del procesamiento del pistache, se obtiene entre 35 y el 45% de ruezno (Elhadeh *et al.*, 2021; Hamed *et al.*, 2020). Otros autores reportan que el porcentaje del ruezno corresponde al 50-60 % del peso total (Cardullo *et al.*, 2021). Es importante encontrar alternativas de aprovechamiento a este residuo, ya que posee un alto contenido de humedad, lo que hace a este residuo propenso a una contaminación microbiana y proliferación de plagas, además de causar problemas ambientales por la materia sólida acumulada, dificultades en la biodegradación de esta, y alteración del suelo por el alto contenido de CF que presenta (Arjeh *et al.*, 2020).

2.1.1. Ruesno de Pistache como Residuo Agroindustrial

La industria agrícola produce una gran cantidad de desechos por año, que, por falta de tratamientos adecuados de eliminación, puede ocasionar problemas de contaminación y daño al medio ambiente, incluida la salud humana (Kumar *et al.*, 2018). Se estima que a nivel mundial se producen alrededor de 1,300 millones de toneladas de subproductos de desecho provenientes de la industria de alimentos. Estos subproductos son responsables del 26% de las emisiones de gases de efecto invernadero por año (Gómez *et al.*, 2021).

Según Kumar *et al.* (2018), los desechos agroindustriales se dividen en residuos industriales y residuos agrícolas, donde estos últimos se dividen en residuos de campo y residuos de proceso (Figura 3). Los primeros comprenden aquellos subproductos encontrados en el campo después de haber pasado el proceso de cosecha en campo, mientras que los últimos son aquellos que se encuentran después de haber procesado la cosecha. Por otro lado, los residuos industriales son aquellos residuos orgánicos que se obtienen de la industria del procesamiento de alimentos.

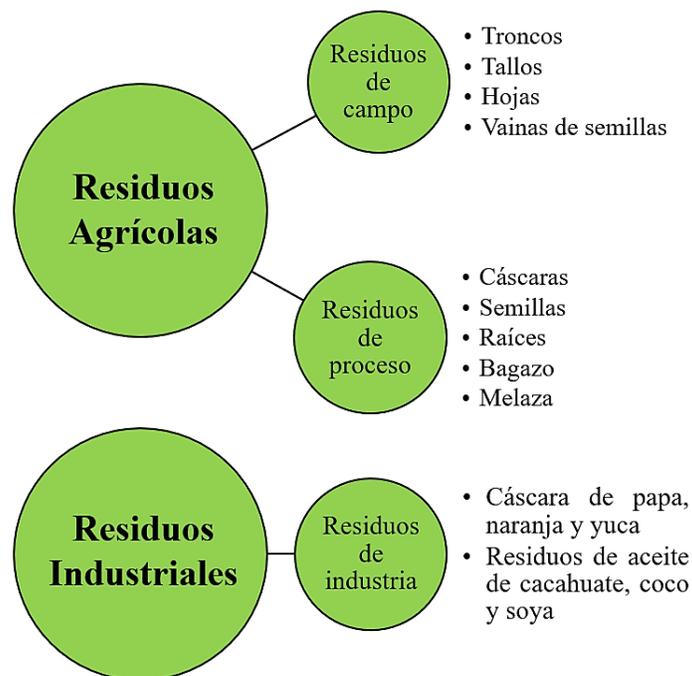


Figura 3. Tipos de desechos agroindustriales. Fuente: Modificado de Kumar *et al.*, (2018).

En muchas industrias no se utilizan los desechos agroindustriales porque no se les ha encontrado un valor, por lo que se ha buscado desarrollar nuevas estrategias de manejo para aprovechar la composición química de estos residuos y disminuir la huella ecológica que pudieran generar en el medio ambiente (Leite *et al.*, 2021; Vargas y Pérez, 2018). Debido a que estos residuos o subproductos se generan en gran cantidad, presentan dificultad de transporte, y tienen un gran potencial para crecimiento microbiano (Gonçalves *et al.*, 2022), se han buscado alternativas donde se implemente el uso de estos desechos, por ejemplo, para alimentación animal, mejora del suelo, producción de fertilizantes y fabricación de productos de interés (Kumar *et al.*, 2018).

El ruezno de pistache (mesocarpio y epicarpio del fruto) (Figura 4) como subproducto aún es de bajo valor económico en países como Turquía, España, Italia y Estados Unidos, mientras que en Irán se le ha buscado alguna utilidad, como alimento para animales, pero la alta cantidad de CF y taninos que presenta interactúan con carbohidratos, proteínas y minerales que se encuentran en la dieta, ocasionando problemas nutricionales (Arjeh *et al.*, 2020).

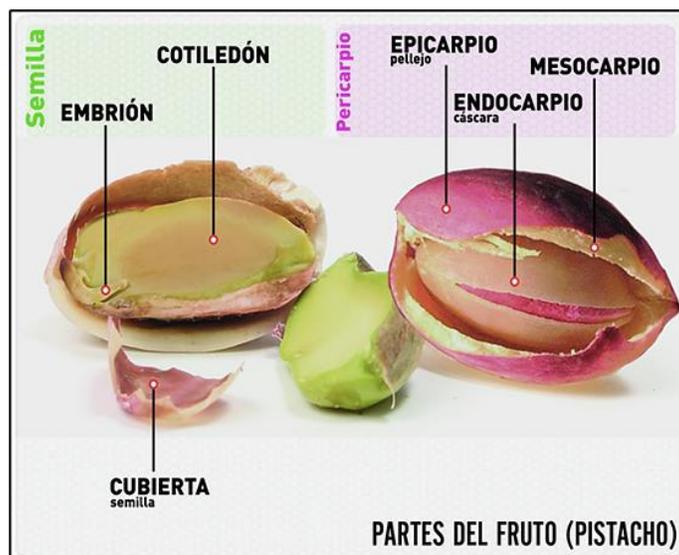


Figura 4. Partes del fruto de pistache.

2.1.2 Ruezno de Pistache como Fuente de Compuestos Fenólicos

Los CF son metabolitos secundarios que se generan en las plantas de forma natural como

mecanismos de defensa contra un riesgo potencial en el entorno, los cuales presentan beneficios a los seres humanos, tanto de forma nutricional como en la salud (Neval-Özbek *et al.*, 2018). La principal característica de estos compuestos es la presencia de uno o más grupos fenol (anillo aromático con un grupo hidroxilo), encontrando que la mayoría de las plantas llevan a cabo su biosíntesis por medio de la ruta del ácido shikímico (Martín, 2018).

Actualmente se tienen clasificados a los CF debido a su estructura en diferentes grupos: fenoles simples que presentan dos o tres grupos hidroxilo en su anillo aromático; ácidos fenólicos (Figura 5) como ácidos hidroxibenzoicos con presencia de grupos carboxilo e hidroxilo en su estructura) y ácidos hidroxicinámicos con carbonos de doble enlace; flavonoides con 3 anillos de diferente conformación química; y taninos (los cuales se unen a proteínas o carbohidratos y son de altos pesos moleculares), donde se encuentra a taninos hidrolizables, taninos condensados, galotaninos y elagitaninos (Peñarrieta *et al.*, 2014).

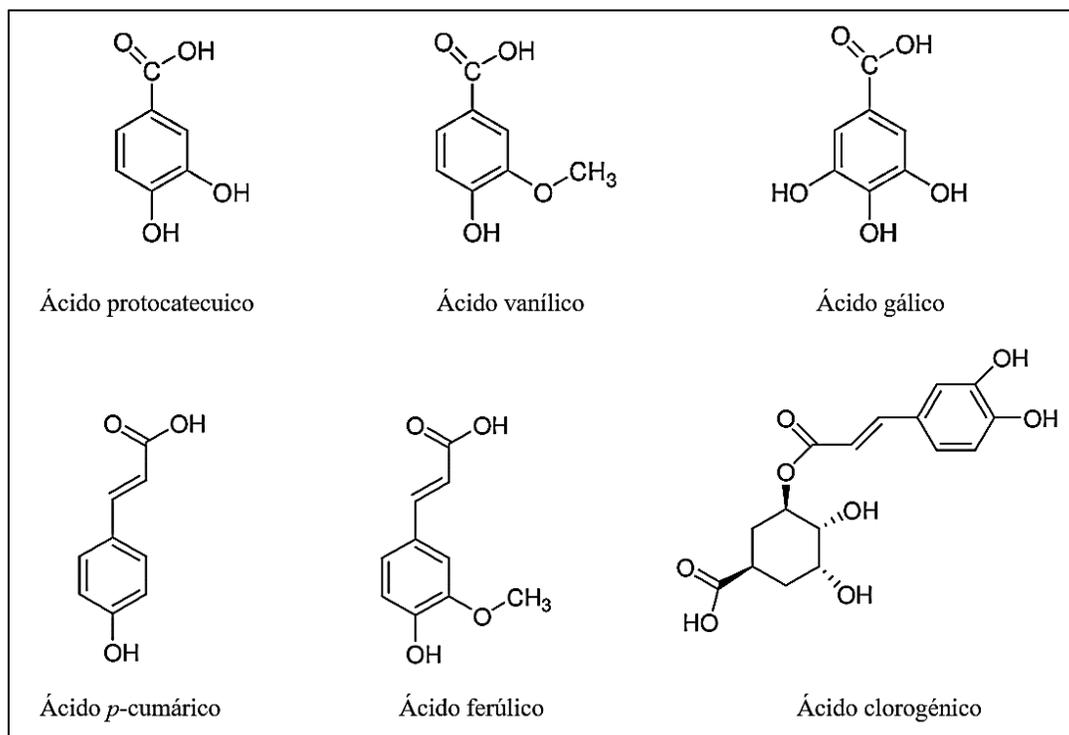


Figura 5. Estructuras de ácidos fenólicos.

Se ha reportado que el ruezno de pistache es fuente rica de compuestos bioactivos, como los CF

(Cuadro 1) o ácidos grasos, encontrando usos en la prevención de la hipertensión, además de efectos anti-diabéticos (Cardullo *et al.*, 2021; Toghiani *et al.*, 2022). De esta manera, el ruezno de pistache ha captado la atención de algunos investigadores, por su bioactividad como antimicrobiano, citotóxico, anti-mutagénico, anti-tumoral y anti-cancerígeno, además de la ya mencionada CA, ofreciendo así alternativas de valor a este subproducto que no ha sido explotado en su totalidad (Neval-Özbek *et al.*, 2018; Noorolahi *et al.*, 2020; Toghiani *et al.*, 2022).

Cuadro 1. Compuestos fenólicos presentes en ruezno de pistache.

ÁCIDOS FENÓLICOS	FLAVONOIDES	TANINOS
Ácidos hidroxibenzoicos: ácido gálico, ácido vanílico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatecuico	Flavononas: eriodictiol, naringenina, naringina	Galotaninos
Ácidos hidroxicinámicos: ácido clorogénico, ácido sinápico, ácido <i>p</i> -cumárico	Flavonoles: quercetina, kaempferol, isorhamnetina	Derivados del grupo galoil
Ácidos anacárdicos	Flavonas: luteolina, apigenina	Proantocianidinas
	Flavanoles: catequina, epicatequina	
	Antocianidinas: cianidina	

Fuente: Arjeh *et al.*, 2020.

Estos CF naturales pueden sustituir a los antioxidantes sintéticos que son utilizados actualmente, como el hidroxietolueno butilado (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA), debido a que estos antioxidantes sintéticos, aunque son efectivos a bajas concentraciones, han presentado dudas sobre posibles efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos y daño hepático (Pakdaman *et al.*, 2021; Serra-Bisbal *et al.*, 2020). Por lo que, al existir estos posibles daños a la salud, es necesario reemplazarlos por compuestos que provengan de fuentes naturales compatibles con el cuerpo humano y que además presenten costos bajos de operación para su obtención (Serra-Bisbal *et al.*, 2020).

Estos compuestos antioxidantes presentan diferentes aplicaciones, principalmente para reducir los procesos oxidativos. Se utilizan como aditivos en alimentos para evitar su deterioro, en medicina son útiles en la prevención de diabetes, enfermedades del corazón, enfermedades hepáticas y cáncer

de órganos, y en cosmética son utilizados para prevenir daños en la piel por efecto solar, entre otros (Sindhi *et al.*, 2013).

2.1.2.1 Actividad antioxidante y antibacteriana del ruezno de pistache. El ruezno de pistache se ha estudiado ampliamente debido a las propiedades biológicas de los CF mencionados en la sección anterior, entre las que destaca la actividad antioxidante (Cuadro 2). Esta bioactividad se debe a los anillos fenólicos encontrados en la estructura de los CF, la cual por medio de los grupos hidroxilo se produce la captación de radicales libres (Martín, 2017; Peñarrieta *et al.*, 2014).

Cuadro 2. Estudios de actividad antioxidante del extracto de ruezno de pistache.

Tipo de ensayo	Actividad antioxidante	Unidad	Referencia
ABTS	1.28 – 3.53	mmol TE/100 g	Moreno-Rojas <i>et al.</i> , (2022)
DPPH	0.86 – 3.22	mmol TE/100 g	
ORAC	3.5 – 15.8	mmol TE/100 g	
ABTS (EC ₅₀)	0.09 – 0.91	mg/mL	Elhadeh <i>et al.</i> , (2021)
DPPH (EC ₅₀)	0.07 – 1.5	mg/mL	
DPPH	~ 50 - 90	% de captación de radicales libres	Pakdaman <i>et al.</i> , (2021)
ABTS	466.73	mgET/g	Noorolahi <i>et al.</i> , (2020)
DPPH	411.98	mgET/g	
FRAP	2,230.8	mgFe ⁺² /g	
DPPH (IC ₅₀)	1.06 – 1.59	mg/mL	Neval-Özbek <i>et al.</i> , (2018)
		% de inhibición de radicales libres/80	Ghandahari <i>et al.</i> , (2018)
ABTS	~ 37 – 50	mg/L	
DPPH	~ 87 – 95	% de inhibición de radicales libres/80	
FRAP	~ 130 - 350	mg/L μMFe ⁺² /80 mg/L	
ORAC	~ 50 – 250	μmol TE/g	Neval-Özbek <i>et al.</i> , (2018)
DPPH (IC ₅₀)	0.70 - 2.73	mg/mL	
DPPH	31.2 – 50.4	% de inhibición de radicales libres/300 μg	Karimi <i>et al.</i> , (2010)
DPPH	~ 88 – 70	% de captación de radicales libres	Abbasi <i>et al.</i> , (2007)

mmol TE = milimoles de equivalentes trolox; μmol TE = micromoles de equivalentes trolox; μMFe⁺² = micromoles equivalentes de ión férrico; mgFe⁺² = miligramos equivalentes de ión férrico.

Estos CF naturales, pueden sustituir a los antioxidantes sintéticos que actualmente son utilizados por ser efectivos a bajas concentraciones, como el hidroxitolueno butilado (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA) (Pakdaman *et al.*, 2021).

Otra propiedad biológica actualmente estudiada en el ruezno de pistache es la actividad antibacteriana (Cuadro 3). Los CF encontrados en este residuo aumentan la permeabilidad de membrana y modifican el pH intracelular de las bacterias, bloqueando la producción de energía por la inhibición de la enzima DNA girasa (Elhadeh *et al.*, 2021; Hasheminya y Dehghannya, 2020; Rajaei *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Estudios de actividad antibacteriana del extracto de ruezno de pistache.

Método	Cepas bacterianas	Resultado	Referencia
MIC	<i>Escherichia coli</i>	0.42 mg/mL	Hasheminya y Dehghannya, (2020)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.31 mg/mL	
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0.26 mg/mL	
	<i>Streptococcus faecalis</i>	0.21 mg/mL	
	<i>Bacillus cereus</i>	0.21 mg/mL	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.16 mg/mL	
Método de difusión por disco (10 µL/disco)	<i>E. coli</i>	20.8 mm	Smeriglio <i>et al.</i> , (2017)
	<i>P. aeruginosa</i>	21.8 mm	
	<i>S. typhimurium</i>	21.5 mm	
	<i>S. faecalis</i>	22.3 mm	
	<i>B. cereus</i>	22.5 mm	
	<i>S. aureus</i>	23.8 mm	
MIC	<i>S. aureus</i>	7.11 mg/mL	Rajaei <i>et al.</i> , (2010)
	<i>E. coli</i>	7.11 mg/mL	
Método difusión por disco (1,200 µg/caja)	<i>B. cereus</i>	12 – 12.6 mm	Rajaei <i>et al.</i> , (2010)
	<i>S. aureus</i>	11.7 – 11.6 mm	
	<i>E. coli</i>	NP	
	<i>P. aeruginosa</i>	NP	
	<i>S. typhi</i>	NP	
MIC	<i>B. cereus</i>	0.5 – 1 mg/mL	Elhadeh <i>et al.</i> , (2021)
	<i>S. aureus</i>	0.5 – 2 mg/mL	
Método de difusión de disco (10 mg/mL)	<i>S. aureus</i>	14.25 – 18.66 mm	Elhadeh <i>et al.</i> , (2021)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	14.23 – 17.25 mm	
	<i>B. cereus</i>	14.25 – 18.75 mm	
	<i>S. entérica</i>	13.83 – 16 mm	
	<i>E. coli</i>	13 – 15.25 mm	
	<i>P. aeruginosa</i>	14 – 15.75 mm	

MIC = concentración mínima inhibitoria; NP = no presentó

Estos compuestos con propiedades biológicas presentes en el ruezno pueden emplearse mediante técnicas de extracción, o si se desea, darle otra finalidad completamente diferente al residuo. Por ejemplo, Vargas y Pérez (2018) describen tres diferentes tecnologías para lograr una mejor utilidad de los residuos agroindustriales: a) Obtención de combustibles: producción de biogás y biodiesel por medio de procesos de gasificación, pirolisis y torrefacción; b) Valorización térmica: producción de energía por medio de procesos de incineración; c) Valorización biológica y química: obtención de productos de interés como enzimas, aceites esenciales, flavonoides y carotenoides por medio de procesos biológicos, como el compostaje, la lombricultura y los diferentes tipos de fermentación, como la FES.

La importancia del ruezno de pistache se basa principalmente en los CF (Toghiani *et al.*, 2022), por lo que sería necesario centrar la atención en la extracción y aprovechamiento de estos compuestos utilizando técnicas que sean amigables al medio ambiente.

2.2. Fermentación en Estado Sólido

La FES es un proceso que utiliza diferentes soportes para el crecimiento de microorganismos en ausencia de agua libre y obtener diferentes productos de interés. Es ampliamente utilizado para la bioconversión de residuos agroindustriales a productos de valor agregado mediante el uso de hongos, levaduras y bacterias (Costa *et al.*, 2018).

En años recientes, se ha utilizado este bioproceso como herramienta asistida complementando a otras técnicas de extracción, ya que los CF, aunque ya han sido liberados por las enzimas generadas por los microorganismos utilizados en la FES, aún se encuentran embebidos en el soporte. Debido a que quedan atrapados en la matriz sólida o sustrato utilizado, es necesario utilizar algún solvente orgánico que sea afín a los compuestos para que se disuelvan en él y se logren separar de la matriz, para luego someterse a técnicas de extracción de bajo impacto ambiental, como ultrasonido, microondas, fluidos supercríticos, maceración o extracción sólido-líquido (Oiza *et al.*, 2022).

Este proceso de valorización biológica utiliza un soporte sólido, que por lo general es alguna materia prima correspondiente a algún subproducto de un proceso agroindustrial, con un determinado porcentaje de humedad para que el microorganismo pueda llevar a cabo su actividad

metabólica y su crecimiento (Costa *et al.*, 2018). Este tipo de fermentación es utilizada en alimentos ya que produce una alta cantidad de productos de interés importantes para consumo humano. La FES permite tener un mayor intercambio de oxígeno en el medio por emplear una matriz sólida porosa, lo que permite una mejor circulación de aire para que el microorganismo lleve a cabo su crecimiento de forma óptima y libere los compuestos de interés (Costa *et al.*, 2018).

De forma general, la FES busca proporcionar al microorganismo un nicho similar al de su hábitat natural, es por esto por lo que este tipo de fermentación ha resultado ser efectiva y con rendimientos altos cuando se hacen las determinaciones para los productos esperados (Costa *et al.*, 2018; Oiza *et al.*, 2022).

2.2.1. Parámetros de Proceso en la Fermentación en Estado Sólido

La correcta elección del microorganismo para desarrollar un proceso de FES debe ir acompañada de una adecuada selección del sustrato, así como las condiciones que permitan el desarrollo óptimo del microorganismo en el medio de cultivo. Asimismo, es importante el control de diversos parámetros, como son la temperatura, humedad, pH, inóculo y aireación (Thomas *et al.*, 2013).

2.2.1.1 Temperatura. La temperatura es uno de los factores más importantes a controlar en un proceso de fermentación, ya que, dependiendo de cada microorganismo, esta influirá en la producción de enzimas, además de los metabolitos secundarios que se deseen recuperar en la fermentación. Lo anterior debido a que las condiciones para obtener los metabolitos de interés son diferentes para cada microorganismo utilizado, algunos pueden ser sensibles a altas temperaturas y culminar con la desnaturalización de sus enzimas, lo que no permitirá crecer al microorganismo de forma adecuada, por no poder llevar a cabo sus procesos metabólicos (Kumar *et al.*, 2020). Para los hongos, su rango de crecimiento oscila entre 20 y 55°C, con un valor óptimo a 30°C (Cerdá-Cejudo *et al.*, 2023; Herrera, 2021). Si se aumenta la temperatura, ocurrirá una modificación en el contenido de humedad, lo que también ocasionará un efecto negativo en el crecimiento del microorganismo, por lo que se requiere hacer una remoción de calor con flujo de aire (Mattedi *et al.*, 2023).

2.2.1.2. Humedad. El contenido de humedad en la FES representa un factor importante en la actividad microbiana, que al modificar este parámetro puede significar un cambio en la producción metabólica del microorganismo (Costa *et al.*, 2018), Aunque es importante señalar que por efecto del crecimiento del microorganismo en el bioproceso se irá reduciendo el contenido de humedad por evaporación, lo cual es provocado por su actividad metabólica (Oiza *et al.*, 2022).

Generalmente, para el crecimiento de microorganismos en FES se utiliza un contenido de humedad de entre el 70 y 80%, para bacterias del 70%, para levaduras oscila entre el 60 y 70%, mientras que para los hongos va del 20 al 70% (Herrera, 2021). La humedad es uno de los parámetros más importantes en FES, presentando efectos positivos o negativos en el crecimiento microbiano. Un alto porcentaje de humedad representa una baja porosidad en el sustrato, y por tanto dificultar la entrada de oxígeno además de aumentar la posibilidad de tener contaminaciones bacterianas, mientras que un bajo porcentaje de humedad puede significar una mala solubilidad de los nutrientes del sustrato, y producir la esporulación en caso de utilizarse un hongo en la FES (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2023; Costa *et al.*, 2018; Herrera, 2021; Kumar *et al.*, 2020;).

2.2.1.3. Sustrato. En la FES se emplea un sustrato sólido e insoluble en agua para el crecimiento microbiano (Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017). Este sustrato puede ser inerte u orgánico, destacando el uso del último, ya que dentro de los sustratos orgánicos se encuentran los residuos agroindustriales (Herrera, 2021). El empleo de un material poroso ayudará a un correcto intercambio gaseoso (O_2 y CO_2) (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2023). El sustrato debe presentar también un contenido de nutrientes balanceado, tomando como base los requerimientos del microorganismo (composición de la biomasa), y los elementos constituyentes de toda materia orgánica: carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno (Herrera, 2021), sin embargo, es importante que contenga una gran cantidad de carbohidratos, para que el microorganismo pueda obtener su fuente de carbono (Lizardi-Jiménez y Hernández-Martínez, 2017).

Este sustrato debe tener la capacidad para soportar la humedad requerida por el microorganismo para su crecimiento, además es importante buscar un sustrato que sea de bajo costo y que esté disponible para su uso en FES, además de que sea un material heterogéneo en cuanto a su composición, para que sea similar al hábitat natural del microorganismo (Kumar *et al.*, 2020).

2.2.1.4. Tamaño de partícula. Para el crecimiento microbiano es importante el tamaño de partícula, ya que el sustrato necesita tener porosidad para realizar un correcto intercambio de gases (CO₂ y O₂) y la transferencia de masa y calor (Kumar *et al.*, 2020). Esto se puede determinar midiendo la densidad de empaque del sustrato en el reactor (Kumar *et al.*, 2020). La correcta elección del tamaño de partícula beneficiará al microorganismo, por ejemplo, un tamaño de partícula grande inducirá una mayor penetración en el sustrato, obteniendo todos los nutrientes disponibles, además de prevenir la aglomeración del sustrato (depende también del contenido de humedad), la cual influye en la respiración del microorganismo (Kumar *et al.*, 2020; Thomas *et al.*, 2013).

2.2.1.5. pH. Uno de los factores a medir con frecuencia en una fermentación es el pH, dado que afecta a la catálisis enzimática, lo que puede influir en la cinética de la fermentación (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2023). En procesos de FES, el pH es un factor difícil de controlar, ya que el sustrato empleado puede ir modificando el pH de la fermentación (Herrera, 2021), sin embargo, si se ajusta el pH óptimo desde el inicio en la FES, es muy complicado que se modifique a valores alejados de la inicial, dado que el sustrato por su composición actúa como amortiguador dándole un poco de estabilidad en su pH (Kumar *et al.*, 2020). Por otro lado, dependiendo del microorganismo utilizado se puede afectar el pH en la FES, ya que microorganismos como *A. niger* o bacterias ácido-lácticas son productores de ácidos orgánicos, generando un medio ácido, mientras que otros microorganismos asimilan estos ácidos orgánicos provocando un incremento en el pH, haciendo un medio alcalino (Herrera, 2021).

2.1.1.6. Inóculo. La concentración del microorganismo a añadir en la fermentación es muy importante, ya que la fase de latencia se puede acortar usando una alta concentración de inóculo, además de prevenir contaminaciones con otros microorganismos por la alta carga de inóculo utilizada (Kumar *et al.*, 2020). El inóculo debe prepararse para poder comenzar de manera óptima el bioproceso, para esto se tiene que seleccionar el microorganismo que mejor se adapte al sustrato utilizado, puesto que los diferentes factores y el medio de cultivo afectan positiva o negativamente el desarrollo de este (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2023). Una alta concentración de inóculo puede ayudar con la catálisis para la bioconversión del sustrato a producto ya que generará enzimas para

hidrolizar los enlaces de los componentes de la pared celular del sustrato y así aprovechar los nutrientes para su crecimiento y desarrollo (Herrera, 2021).

2.1.1.7 Aireación. La aireación es necesaria en la fermentación, un flujo de aire alto ayuda a disipar el calor generado por la respiración y actividad metabólica del microorganismo, mientras que un flujo bajo ayuda a evitar la pérdida de humedad en el medio (Casciatori y Thoméo, 2018; Jachimowicz *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2018). La aireación constante en el reactor promueve la oxigenación en el proceso para el crecimiento y desarrollo óptimo del microorganismo, ya que ayuda a eliminar también el CO₂ del medio y los metabolitos volátiles que pueden causar inhibición (Méndez-González *et al.*, 2021; Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012). Para tener un correcto intercambio de gases es necesario que haya porosidad en el sustrato, ya que una aglomeración de este evitaría la correcta respiración del microorganismo. Por otro lado, se recomienda que el aire suministrado sea con un humidificador, para evitar descensos en la humedad del reactor, ya que el crecimiento del microorganismo produce calor, el cual promueve la evaporación del agua en el proceso, desencadenando la pérdida de esta y con esto problemas en el crecimiento del microorganismo (Mattedi *et al.*, 2023). Por otro lado, la aireación puede afectar en la producción de enzimas de los microorganismos, debido a que afecta positiva o negativamente el crecimiento microbiano según el suministro de aire utilizado (Rodríguez-Fernández *et al.*, 2012).

Existen estudios que han realizado exploratorios con algunos de los parámetros mencionados anteriormente en diferente sustrato. López-Cárdenas *et al.* (2023) evaluaron valores de humedad de 50 y 60% y concentraciones de inóculo de 1×10^6 y 1×10^7 esp/gms de *A. niger* GH1; Cerda-Cejudo *et al.*, (2022) evaluaron valores del 50, 60 y 70% de humedad, así como concentraciones de inóculo de 1×10^7 , 1.5×10^7 y 2×10^7 esp/g de *A. niger* GH1. Por otra parte, De León-Medina *et al.*, (2020) exploraron el efecto de dos concentraciones de inóculo (2×10^6 y 2×10^7 esp/g) de *A. niger* GH1; y Buenrostro *et al.*, (2023) evaluaron humedades del 50 y 60%. Con respecto a la aireación, Ridder *et al.*, (1999) evaluaron niveles de aireación de 0, 0.29 y 0.57 VKgm/min, mientras que Méndez-González *et al.*, (2020) evaluaron flujos de 0.16, 0.33, 0.66, 0.96 y 1.28 VKgm/min.

Los estudios mencionados anteriormente reportan que la humedad presenta un efecto positivo, que al incrementar el contenido de humedad en valores de entre 50 y 60 %, también lo hacen el

contenido de CF y la CA. La concentración de inóculo utilizada presenta un efecto positivo, donde al utilizar valores entre 1×10^7 y 2×10^7 esp/gms se incrementan los contenidos de CF y CA. Por último, la aireación suministrada resulta en diferentes valores dependiendo si la finalidad es la producción de esporas, proteínas o actividad enzimática. Debido a esto, es necesario establecer los parámetros óptimos para cada matriz vegetal, debido a que las características fisicoquímicas de cada material y los procesos metabólicos de los diferentes microorganismos utilizados son diferentes.

2.2.2. Elección de Microorganismos en Procesos de Fermentación en Estado Sólido

Se ha reportado el uso de bacterias, levaduras y hongos filamentosos para la FES, encontrando que el último mencionado es el que mejor se adapta a este proceso (Cerdea *et al.*, 2023). Herrera (2021) menciona que en FES se encuentran tres zonas de contacto del microorganismo con el sustrato: fase sólida (sustrato en el cual se coloca el microorganismo); fase gaseosa (corresponde al aire que se encuentra entre las partículas del sustrato utilizado para intercambio gaseoso); y fase líquida (correspondiente a la humedad que hay en el sustrato), por lo que el correcto suministro de estas tres fases puede significar el éxito del proceso.

La FES ha requerido el uso de diferentes microorganismos, donde se ha reportado la utilización de los hongos *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. terreus*, *Streptomyces* spp., *Rhizopus arrhizus*, *R. oryzae*, *Beauveria bassiana*, *Colletotrichum truncatum*, *Gibberella fujikoroii* y *Mucor subullissimus*, además de las bacterias *Amycolatopsis mediterranean*, *Xanthomonas campestris*, *Bacillus licheniformis*, *Burkholderia* sp, *Brevibacterium* sp. y *Pseudomonas* sp, por mencionar algunos (Juárez, 2015; Kumar *et al.*, 2018).

Los hongos son los microorganismos más utilizados para la FES (Cuadro 4), siendo los hongos filamentosos aquellos que mejores rendimientos producen, dado que al encontrarse en cualquier nicho ecológico y degradar la materia orgánica pueden utilizarse en una gran variedad de sustratos para llevar a cabo la liberación de metabolitos secundarios de interés (Ramos, 2012). Se conoce que al utilizar estos hongos filamentosos se produce una mejor penetración del sustrato por su crecimiento hifal, además de que pueden crecer en sustratos con bajos contenidos de humedad,

dándole una ventaja mayor en estos aspectos sobre organismos unicelulares utilizados en FES, como las levaduras y las bacterias, que tienen un requerimiento de agua alto (Martínez-Ávila *et al.*, 2013; Thomas *et al.*, 2013).

Cuadro 4. Estudios de FES de residuos agroindustriales y especies vegetales poco valoradas empleando diferentes hongos.

Sustrato	Microorganismo	Producto	Referencia
Vainas de cascalote	<i>A. niger</i> GH1	Aumento de fenoles totales 2.19 veces	López-Cárdenas <i>et al.</i> (2023)
Cáscara de rambután mexicano	<i>A. niger</i> GH1	Aumento de ácido elágico 4.04 veces	Cerda-Cejudo <i>et al.</i> (2022)
Rosa castilla	<i>A. niger</i> GH1	Aumento de fenoles totales 1.66 veces	De León-Medina <i>et al.</i> , (2020)
Semilla de mango	<i>A. niger</i> GH1	Aumento de fenoles totales 2.3 veces	Torres-León <i>et al.</i> (2019)
Subproductos de higo	<i>A. niger</i> HT4	Aumento de fenoles totales 5.48 veces	Buenrostro-Figueroa <i>et al.</i> (2017)
Ruezno de pistache	<i>A. terreus</i> ATCC74135	Disminución de fenoles totales 0.82 veces	Karimi <i>et al.</i> , (2010)
Ruezno de pistache	<i>P. chrysosporium</i>	Aumento de fenoles totales 0.29 veces	Abbasi <i>et al.</i> , (2007)

Los hongos filamentosos son excelentes productores de enzimas hidrolíticas como xilanasas, celulasas y pectinasa, lo que le ayuda a adaptarse y colonizar el sustrato en el que se está realizando la FES. Sin embargo, es necesario elegir la especie adecuada para el sustrato, ya que dependiendo el producto que se desea obtener, es fundamental conocer la fisiología del microorganismo, además de sus requerimientos de nutrientes, como carbono y nitrógeno (Herrera, 2021; Oiza *et al.*, 2022; Thomas *et al.*, 2013).

2.2.2.1. Género *Aspergillus*. El género *Aspergillus* es un grupo de hongos microscópicos, que dada su taxonomía se encuentra situado en el reino Fungi; phylum Ascomycota; clase Eurotiomycetes; orden Eurotiales; familia Aspergillaceae; género *Aspergillus* (GBIF Secretariat, 2023). Se conocen alrededor de 185 especies de este género, destacando que es uno de los más importantes y reconocidos a nivel mundial, ya que son utilizados para la generación de diferentes productos,

bioconversiones de sustrato y producción de enzimas (Pitt y Hocking, 2009).

La morfología de estos hongos se caracteriza por su conidióforo (Figura 6), el cual es una estructura que alberga los conidios, que son esporas asexuales (Pitt y Hocking, 2009). En cuanto a su micelio, puede llegar a presentar colores de distinta tonalidad, como café pardo, amarillo, verde, blanco y negro (Ramos, 2012). Puede crecer a temperaturas que se encuentran entre 6 y 55°C en una gran variedad de sustratos, que pueden ser desde matrices vegetales hasta tejidos de animales (Salazar y Rua, 2012).

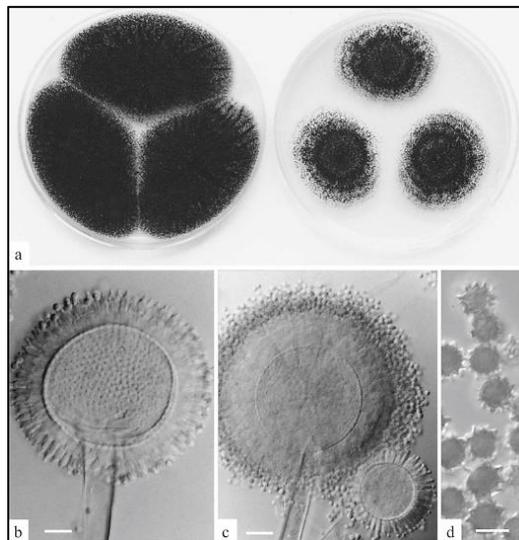


Figura 6. Estructuras de *A. niger*. a) Colonias, b y c) Conidióforos, C) Esporas. Fuente: Pitt y Hocking, 2009.

Las especies del género *Aspergillus* son de interés industrial, ya que algunas de sus especies como *A. niger*, *A. oryzae* y *A. terreus* han sido utilizados para la fermentación de alimentos (Ramos, 2012). Su valor en la industria alimentaria radica en que gracias a que fermenta azúcares, se da la producción de ácido cítrico y glucónico, los cuales se conocen por su importancia en la industria de alimentos, también la obtención de alcohol y la producción de enzimas (Cuadro 5) (Gómez *et al.*, 2021; Juárez, 2015).

Cuadro 5. Enzimas extracelulares de las diferentes especies de *Aspergillus*.

Microorganismo	Enzimas
<i>A. flavus</i>	Peptidasa, fitasa, proteasa, lipasa, DNasa, elastasa, keratinasa, quitinasa, amilasa, poligalacturonasa
<i>A. oryzae</i>	Hidrolasa, amilasa, tanasa, proteasa, fitasa, lipasa, xylanasa, hexosaminidasa, naranginasa, peptidasa
<i>A. niger</i>	Proteasa, lipasa, peptinasa, amilasa, fitasa, keratinasa, DNasa, elastasa, α -galactosidasa, nucleasa, hidrolasa, β -glucosidasa, xylanasa, tirosinasa
<i>A. fumigatus</i>	Fitasa, keratinasa, lipasa, proteasa, DNasa, elastasa, amilasa, tanasa, xylanasa.
<i>A. clavatus</i>	Amilasa, celulasa
<i>A. thermomutatus</i>	Invertasa
<i>A. allahabadii</i>	Dextrinasa

Fuente: Gómez *et al.*, 2021.

Aspergillus es un género reconocido por sus enzimas extracelulares de importancia económica, ya que son ampliamente utilizadas para suplementos y aditivos en alimentos. Dentro de estas enzimas se han reportado la tanasa, α -amilasa, oxidasa, catalasa, deshidrogenasa, celulasa y pectinasa (Gómez *et al.*, 2021).

2.2.2.2. Modelos matemáticos para medir el crecimiento microbiano. En biotecnología y microbiología se ha implementado el uso de modelos matemáticos como herramienta predictiva para observar de forma cualitativa y cuantitativa el comportamiento del crecimiento microbiano a través del tiempo bajo diferentes condiciones y explicar cambios en la biomasa, composición del medio y/o metabolitos secundarios durante el bioproceso (Chambi-Rodríguez y Torres-Jiménez, 2021; Fernández *et al.*, 2022). Estos modelos matemáticos pueden generar una curva de crecimiento sigmoideal que nos presenta el comportamiento de poblaciones microbianas por efecto del sustrato, pH, humedad, actividad de agua, temperatura, nutrientes, condiciones de empaado, entre otros (Chambi-Rodríguez y Torres-Jiménez, 2021; Garre-Pérez *et al.*, 2016). El sentido biológico está implicado en los modelos Logístico, Gompertz, Richards, Monod, Brody, Von Bertalanffy, Weibull, los cuales producen predicciones realistas, donde se contemplan circunstancias que influyen en el desarrollo de la población, como la limitación de los recursos, condiciones de cultivo y el crecimiento finito de microorganismos (Bello, 2014; Villegas *et al.*, 2019).

De forma general, los microorganismos presentan diferentes fases durante su crecimiento (Figura 7). La primera es la fase de latencia o adaptación, donde el microorganismo a pesar de tener condiciones favorables para su crecimiento requiere un periodo de adaptación al nuevo ambiente en que se encuentra, y este tiempo va a depender de las condiciones del medio y el estado fisiológico del microorganismo. La segunda corresponde a la fase de aceleración, donde habrá un aumento pequeño en la biomasa del microorganismo debido a que su enfoque energético se encuentra en la generación de enzimas que le permitan desarrollarse en el medio. La tercera es la fase de crecimiento exponencial o logístico, donde el microorganismo se multiplica a máxima velocidad aumentando considerablemente su número de células presentando una tasa específica de crecimiento máxima (μ_{max}) constante. La cuarta corresponde a la fase de desaceleración, donde en el medio se produce un agotamiento de nutrientes, represión catabólica o alguna modificación en las condiciones del cultivo y por ende su disminución del crecimiento. La quinta es la fase estacionaria o de mantenimiento, donde el microorganismo interrumpe su crecimiento y utiliza la energía disponible para su mantenimiento metabólico, ocasionando un equilibrio entre su crecimiento y muerte. Por último, se observa la fase de muerte, donde comienza el deceso del microorganismo por la culminación de los recursos del medio y presencia de sustancias tóxicas para el microorganismo, impidiendo su reproducción (Bello, 2014; Garre-Pérez *et al.*, 2016; Villegas *et al.*, 2019).

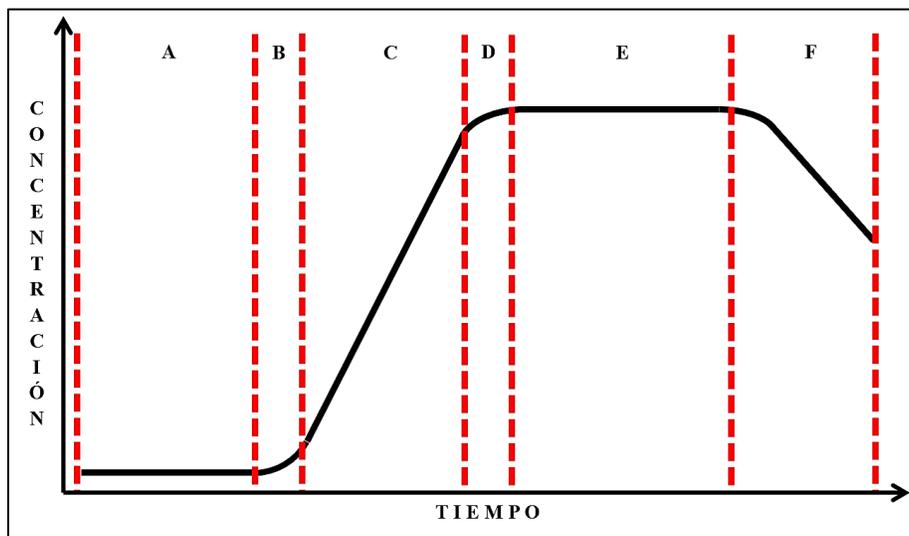


Figura 7. Fases del crecimiento microbiano. A) Fase de adaptación o latencia, B) Fase de aceleración, C) Fase de crecimiento exponencial o logarítmico, D) Fase de desaceleración, E) Fase estacionaria o de mantenimiento, y F) Fase de muerte.

En cuanto a los parámetros cinéticos que se pueden obtener de estos modelos, encontramos la tasa específica de crecimiento (μ), μ_{\max} , la fase lag (fase de adaptación) y el coeficiente de determinación entre los datos reales y los obtenidos con el modelo utilizado, para observar si se presenta un buen ajuste (Bello, 2014; Gu *et al.*, 2016).

Debido a lo mencionado en esta sección de antecedentes, se busca una alternativa para la valorización del ruezno de pistache. Una opción biotecnológica viable que ha tomado un papel importante en el aprovechamiento de residuos agroindustriales es la FES, puesto que es una herramienta asistida amigable al medio ambiente y rentable económicamente (Herrera, 2021). Actualmente ha tomado relevancia la utilización del hongo *A. niger*, debido a que es un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) (Thegarathah *et al.*, 2022) y existen estudios de su uso en FES con vainas de cascalote (López-Cárdenas *et al.*, 2023), cáscara de granada (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2023), cáscara de rambután mexicano (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2022), residuos de piña (Paz-Arteaga *et al.*, 2023; Tang y Hassan, 2020), semilla de mango (Torres-León *et al.*, 2019), subproductos de higo (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2017), rosa castilla (De León-Medina *et al.*, 2020), entre otros, donde ha favorecido la recuperación de CF gracias a su producción de enzimas que degradan la pared celular de los residuos agroindustriales mejorando de esta manera el contenido fenólico (Brück *et al.*, 2022; Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2023; Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2018; De León-Medina *et al.*, 2020; Gómez *et al.*, 2021; López-Cárdenas *et al.*, 2023; Paz-Arteaga *et al.*, 2023; Torres-León *et al.*, 2019).

3. HIPÓTESIS

El modelo *Aspergillus niger*-FES permitirá obtener CF con actividad biológica a partir del ruezno de pistache.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Obtener CF a partir del ruezno de pistache por medio de FES con *Aspergillus niger*.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el potencial del ruezno de pistache para ser empleado como soporte en un proceso de FES y selección de tiempo de fermentación.
- Evaluar el efecto de la humedad, inóculo y aireación en FES con *A. niger* GH1 sobre la CA y liberación de CF a partir de ruezno de pistache.
- Determinar el efecto de la fermentación sobre el potencial antioxidante, antibacteriano y perfil de CF del tratamiento seleccionado.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Preparación del Ruezno de Pistache

El desarrollo de la presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Subsede Delicias. Para el estudio se empleó ruezno de pistache, var. Sfax (población experimental), el cual se obtuvo de parcelas de pistache ubicadas en el municipio de Meoqui, Chihuahua, México. Para el secado de la muestra se siguió la metodología descrita por Erşan *et al.* (2016) con algunas modificaciones. El material se sometió a un proceso de desinfección con lámparas UV durante 1 h, secado al sol durante 6 h, posteriormente secado a 60°C por 72 h. Por último, se realizó la molienda hasta alcanzar un tamaño de partícula de 0.85 mm y se almacenó en frascos protegidos de la luz hasta su uso.

5.2 Activación y Preparación de *Aspergillus niger* GH1

Se empleó la cepa *A. niger* GH1 perteneciente a la colección de cultivos del Departamento de Investigación en Alimentos de la Universidad Autónoma de Coahuila y depositada en la Micoteca de la Universidad de Minho con el número MUM:23.16. La cepa se reactivó en agar papa-dextrosa (PDA) (BIOXON, MÉXICO) y se incubó a 30°C durante 5 d. Una vez activa, se inoculó en matraces Erlenmeyer (250 mL) con 30 mL de PDA y se incubó a 30°C durante 5 d. Las esporas se colectaron con una solución estéril de Tween-80 al 0.01 % (v/v), se agitó suavemente y se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer.

5.3 Etapa 1: Potencial del Ruezno de Pistache como Soporte en Fermentación en Estado Sólido y Selección de Tiempo de Fermentación.

5.3.1 Caracterización Físicoquímica de Ruezno de Pistache

5.3.1.1 Índice de absorción de agua (IAA). Para la determinación del IAA, se colocaron 1.5 g de muestra en un tubo FALCON de 50 mL y se añadieron 15 mL de agua destilada. Posteriormente, la muestra se agitó durante 1 min en un vórtex (FOUR E'S SCIENTIFIC, CHINA) y se centrifugó a 3000 x g durante 10 min. Se descartó el sobrenadante, se recuperó la muestra húmeda, se pesó y se calculó su IAA de acuerdo con la ecuación 1:

$$IAA = \frac{\text{Peso del gel}}{\text{Peso de muestra seca}} \quad (1)$$

Se expresó como g de gel/g de muestra seca, de acuerdo con lo reportado por Torres *et al.* (2019).

5.3.1.2 Humedad máxima del ruezno de pistache. Para determinar la humedad máxima del ruezno de pistache se siguió la metodología descrita por Cerda-Cejudo *et al.*, (2022). Se utilizó la muestra del gel obtenido en el procedimiento de IAA y se colocó 1 g de muestra en una termobalanza (MB120 OHAUS, CHINA) para obtener el contenido de humedad. Después se utilizaron los valores del IAA y el contenido de humedad para calcular la humedad máxima del ruezno de pistache de acuerdo con la ecuación 2, 3, 4, 5 y 6:

$$\text{Balance general} \\ M_1 + M_2 = M_3 \quad (2)$$

Balance de sólidos y agua

$$x_a M_1 = M_1 - \left(\frac{M_1}{100} * \text{Contenido de humedad \%} \right) \quad (3)$$

$$1 - x_a M_1 = x_s M_1 \quad (4)$$

$$M_1 * x_s M_1 = M_3 * x_s M_3 \quad (5)$$

$$1 - x_s M_3 = x_a M_3 \quad (6)$$

Donde:

M_1 = Peso muestra seca (g) de IAA; M_2 = Agua (g); M_3 = Peso del gel (g) de IAA; x_a, M_1 = Fracción de agua en M_1 ; x_a, M_3 = Fracción de agua en M_3 ; x_s, M_1 = Fracción de sólidos en M_1 ; x_s, M_3 = Fracción de sólidos en M_3 .

5.3.1.3 Punto crítico de humedad (PCH). El PCH representa el punto de inflexión entre el agua libre y el agua ligada, y su determinación permite conocer la proporción de agua libre que tiene el material, y que estará disponible para el crecimiento y desarrollo del microorganismo (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). Para determinarlo, se pesó 1 g de muestra en una termobalanza (MB120 OHAUS, CHINA) a 105°C. Se registraron los cambios en el peso y humedad del material, y se elaboraron las curvas de secado. Con los datos obtenidos se calcularon los deltas de cada peso para determinar la velocidad de secado respecto al tiempo (delta de peso/tiempo). Se graficó la humedad (%) vs la velocidad de secado (g/min) y se calculó la regresión lineal durante la fase de eliminación del agua libre y el agua ligada. Finalmente se igualaron ambas ecuaciones para determinar la intersección, que corresponde al PCH (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014).

5.3.1.4 Densidad de empaque (DE). La DE se determinó colocando 4 g de ruezno de pistache seco y molido en una probeta volumétrica de 10 mL, después se agitó en un vórtex (FOUR E'S SCIENTIFIC, CHINA) y se registró el volumen hasta no obtener cambios en el mismo. Por último, se obtuvo la DE dividiendo la masa entre el volumen ocupado por la muestra en la probeta y se expresó como g/cm^3 (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014).

5.3.2 Cinética de Respiración

Los modelos matemáticos Logístico y Gompertz se han obtenido a partir de características y formas de crecimiento de poblaciones, por lo que poseen un sentido biológico (Fernández *et al.*, 2022). Ambos modelos son utilizados en situaciones donde existe una limitación de nutrientes y se puede presentar un crecimiento máximo del microorganismo, y al poseer los mismos parámetros, la única diferencia entre ellos radica en sus curvas al hacer un diagrama de fase, ya que se muestran asimétricas y simétricas para Gompertz y Logístico, respectivamente. Esta diferencia está dada en que Gompertz muestra un crecimiento inicial lento, mientras que en el Logístico es rápido (Quiroz, 2017). Para el análisis de respirometría se siguió la metodología descrita por Méndez-González *et al.* (2021). Se utilizó un analizador respirométrico durante la fermentación, y se tomaron lecturas de datos de producción de CO_2 , consumo de O_2 y flujo de aire cada hora durante 72 h para evaluar de forma indirecta el crecimiento del hongo *A. niger* GH1. Los datos se analizaron por medio de las ecuaciones de los modelos Logístico y Gompertz, de acuerdo con las ecuaciones 7 y 8.

Modelo Gompertz

$$f(t) = CO_{2\max}^{-b^{-\mu t}} \quad (7)$$

Donde: t = tiempo; μ = tasa específica de crecimiento; $CO_{2\max}$ = valor máximo de CO_2 ; b = diferencia entre concentración de CO_2 inicial y final.

Modelo Logístico

$$f(t) = \frac{CO_2 \max}{1 + C^{-\mu t}} \quad (8)$$

Donde: t = tiempo; μ = tasa específica de crecimiento; $CO_2 \max$ = valor máximo de CO_2 ; C = diferencia entre la concentración de CO_2 inicial y final.

5.3.3 Preparación de Fermentación en Estado Sólido

La FES se realizó en reactores de columna de 60 cm³. 5 g ruezno de pistache se mezclaron con 5 mL de medio de cultivo Czapek-Dox [KCl (1.52 g/L), KH₂PO₄ (3.04 g/L), MgSO₄ (1.52 g/L) y NaNO₃ (7.65 g/L)] previamente inoculado con *A. niger* GH1 (1×10⁶ esporas/mL). El proceso de fermentación se realizó de 0 a 72 h a 30°C, aireación de 1 VKgm (Volumen de aire por kilogramo de masa por minuto) y humedad de 50 %, tomando muestras en intervalos de 12 h cada una para la obtención de extractos, utilizando el tiempo de 0 h como control.

Para obtener los extractos, se agregaron al material fermentado una solución de etanol, agua destilada y ácido láctico (80:19:1 v/v/v), en relación 1:5 (masa/volumen). Cada muestra se sonicó durante 20 min y se filtró utilizando algodón y membranas de 0.45 μm (Millipore™). Los extractos se almacenaron en viales de 2 mL a -18 °C para posteriormente determinar el contenido de fenoles hidrolizables (FH) y condensados (FC), así como la CA acorde al ensayo FRAP, y frente a los radicales DPPH y ABTS.

5.3.4 Determinación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante

5.3.4.1 Fenoles hidrolizables. Para determinar el contenido de FH del ruezno de pistache, se colocaron 20 μL de muestra y 20 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (2 N) en una microplaca de 96 pocillos y se dejó reposar durante 5 min. Después se añadieron 20 μL de una solución de carbonato

de sodio 0.01 M y se dejó reposar durante 5 min. Al final se añadieron 125 μ L de agua destilada y se midió la absorbancia a 790 nm en un espectrofotómetro (MULTISKAN GO, THERMO SCIENTIFIC, FINLANDIA) (Wong-Paz *et al.*, 2014). Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g de masa seca (mgAG/gms). Se utilizó una curva patrón de ácido gálico (Ec. $y = 1.8216x$).

5.3.4.2 Fenoles condensados. Para determinar el contenido de FC del ruezno de pistache se utilizó reactivo férrico y HCl-butanol (1:9 v/v). Se colocaron 250 μ L de muestra, 1500 μ L de HCl-butanol y 50 μ L de reactivo férrico en un tubo de cierre hermético. La mezcla obtenida se mantuvo en ebullición durante 40 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron y se colocaron 200 μ L en una microplaca de 96 pocillos, donde se registró la absorbancia a 460 nm en un lector de microplacas (MULTISKAN GO, THERMO SCIENTIFIC, FINLANDIA) (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2022). Los resultados se expresaron como mg de catequina/g de masa seca. Se utilizó una curva patrón de catequina (Ec. $y = 0.6359x$).

Los fenoles totales (FT) se determinaron sumando los valores de FH y FC, expresando los resultados como mg/g de masa seca.

5.3.4.3 Ensayo DPPH. Para determinar la CA del ruezno de pistache frente al radical DPPH, se preparó una solución madre de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo (SigmaAldrich®)) 60 μ M en metanol absoluto. Se colocaron 7 μ L de muestra y 193 μ L de reactivo DPPH en una microplaca de 96 pocillos y se mantuvo en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. Se utilizó un espectrofotómetro (MULTISKAN GO, THERMO SCIENTIFIC, FINLANDIA) para medir la absorbancia a 517 nm (Meléndez *et al.*, 2014). Los resultados se expresaron como mg de Trolox/g de masa seca. Se utilizó una curva patrón de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Ec. $y = 2.2641x$).

5.3.4.4 Ensayo ABTS. Para determinar la CA del ruezno de pistache frente al radical ABTS, se preparó una solución ABTS ((2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato)) (Sigma-Aldrich®))

7 mM en etanol absoluto y se mezcló con una solución de persulfato de potasio 2 mM en relación 2:1 v/v. La solución resultante se mantuvo en oscuridad durante 12 a 16 h a temperatura ambiente. Para el ensayo, se colocaron 10 μ L de muestra y 190 μ L de reactivo ABTS en una microplaca de 96 pocillos y se utilizó un espectrofotómetro (MULTISKAN GO, THERMO SCIENTIFIC, FINLANDIA) para medir la absorbancia a 734 nm (Rojo-Gutiérrez *et al.*, 2021). Los resultados se expresaron como mg de Trolox/g de masa seca. Se utilizó una curva patrón de Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (Ec. $y = 3.4308x$).

5.3.4.5 Ensayo FRAP. Para determinar el poder antioxidante reductor del hierro (FRAP, por sus siglas en inglés) del ruzno de pistache, se preparó una solución buffer de acetatos 0.3 M, pH 3.6, una solución de 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ; Sigma-Aldrich®) 10 mM en HCl 40 mM y una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM, después se mezclaron las soluciones en relación 10:1:1 (v/v/v) y se incubó el reactivo FRAP a 37°C durante 30 min. Para el ensayo se colocaron 6 μ L de muestra, 18 μ L de agua destilada y 180 μ L de reactivo FRAP en una microplaca de 96 pocillos incubándose a 37°C por 1 h. Posteriormente se utilizó un espectrofotómetro (MULTISKAN GO, THERMO SCIENTIFIC, FINLANDIA) para medir la absorbancia a 593 nm (López-Cárdenas *et al.*, 2023). Los resultados se expresaron como mg de Fe^{+2} /g de masa seca. Se utilizó una curva patrón de Fe_2SO_4 (Sigma-Aldrich®) (Ec. $y = 7.5781x$).

5.3.5 Diseño Experimental

En la primera etapa se utilizó un diseño completamente al azar para determinar el efecto del tiempo en la fermentación con 7 niveles (0, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h) sobre el contenido de FT (FH + FC) y la CA (DPPH, ABTS y FRAP) del ruzno de pistache fermentado. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

5.3.6 Análisis de Datos

Los datos obtenidos se evaluaron mediante un análisis de correlación de Pearson y un análisis de varianza (ANOVA, $\alpha \leq 0.05$), posteriormente, se realizó una prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Los resultados se examinaron mediante el software estadístico SAS 9.0.

5.4 Etapa 2: Efecto de la Fermentación en Estado Sólido con *A. niger* sobre la Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante a partir del Ruezno de Pistache.

Una vez seleccionado el tiempo de máxima liberación de CF y CA, se realizó una fermentación a dicho tiempo. Para ello, se siguió la metodología descrita en la sección 5.3.3, evaluando el contenido de humedad (40, 50 y 60%), concentración de inóculo (1×10^6 , 5×10^6 y 1×10^7 esp/mL) y aireación (0.5, 1 y 1.5 VKgm), para determinar el contenido de FH y FC, así como la CA mediante ensayos DPPH, ABTS y FRAP, siguiendo la metodología descrita en la sección 5.3.4.

Las mejores condiciones de proceso fueron aquellas que presentaron la máxima liberación de CF y mayor CA, y se seleccionaron como tratamiento para la etapa 3.

5.4.1 Diseño Experimental

En la segunda etapa, se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 3^k para evaluar el efecto de la humedad (40, 50 y 60%), concentración de inóculo (1×10^6 , 5×10^6 y 1×10^7 esp/mL) y aireación (0.5, 1 y 1.5 VKgm) sobre la CA (DPPH, ABTS y FRAP) y contenido de FT. Se utilizó el programa STATISTICA 7.0 para obtener una matriz experimental Box-Behnken 3^k con un total de 15 tratamientos (Cuadro 6). Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Cuadro 6. Matriz experimental Box-Behnken 3^k para evaluar el efecto de la concentración de inóculo, humedad y flujo de aire, sobre el contenido de FT y la CA del ruezno de pistache.

Factor	-1	0	1
Humedad (%)	40	50	60
Inóculo (esp/mL)	1x10 ⁶	5x10 ⁶	1x10 ⁷
Aireación (VKgm)	0.5	1	1.5

Tratamiento	Humedad (%)	Inóculo (esp/gms)	Aireación (VKgm)
1	1	0	-1
2	-1	0	-1
3	0	-1	-1
4	0	1	-1
5	-1	-1	0
6	1	-1	0
7	-1	1	0
8	1	1	0
9	-1	0	1
10	1	0	1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

VKgm = volumen por kilogramo de masa por minuto
gms = gramos de masa seca

5.4.2 Análisis de Datos

Los datos obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de 3 factores (ANOVA, $\alpha \leq 0.05$), y posteriormente, se realizó una prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Los resultados se analizaron mediante el software estadístico SAS 9.0.

5.5 Etapa 3: Potencial Antibacteriano del Extracto de Ruezno de Pistache Fermentado.

Para evaluar el potencial biológico de los extractos fermentados de ruezno de pistache, se realizó una fermentación a mayor volumen bajo las mejores condiciones seleccionadas en la etapa 2.

5.5.1. Purificación y Caracterización del Extracto Fermentado

El extracto obtenido fue purificado mediante cromatografía en columna, empleando una columna de Amberlita XAD-16, utilizando como eluyente agua destilada para eliminar compuestos no deseables, y posteriormente con etanol absoluto para recuperar la fracción rica en polifenoles totales de ruezno de pistache (Ascacio-Valdés *et al.*, 2010). El solvente se eliminó por evaporación hasta obtener un polvo, que se empleó para determinar el contenido de CF presentes mediante un análisis RP-HPLC-ESI-MS. El análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa se realizó conforme a la metodología utilizada por Cerda-Cejudo *et al.*, (2022) en un sistema HPLC Varian que incluye un muestreador automático (Varian ProStar 410, EE. UU.), una bomba ternaria (Varian ProStar 230I, EE. UU.) y un detector PDA (Varian ProStar 330, EE. UU.). También se utilizó un espectrómetro de masas con trampa de iones (Varian 500-MS IT Mass Spectrometer, EE. UU.) acoplado al sistema HPLC, equipado con una fuente de iones por electropulverización. Se inyectaron muestras (5 μ L) en una columna Denali C18 (150 mm \times 2.1 mm, 3 μ m, Grace, EE. UU.). La temperatura del horno se mantuvo a 30°C. Los eluyentes fueron ácido fórmico (0.2 %, v/v; disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B). Se aplicó el siguiente gradiente: inicial, 3% B; 0–5 min, 9% B lineal; 5 a 15 min, 16% B lineal; 15–45 min, 50% B lineal. El caudal se mantuvo a 0.2 mL/min, registrando lecturas a 245, 280, 320 y 550 nm. Todo el efluente (0.2 mL/min) se inyectó en la fuente del espectrómetro de masas, sin dividirse. Todos los experimentos de MS se llevaron a cabo en modo negativo $[M-H]^{-1}$. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador y helio como gas amortiguador. Los parámetros de la fuente de iones fueron: voltaje de pulverización 5.0 kV y voltaje capilar y temperatura fueron 90.0 V y 350°C, respectivamente. Los datos se recopilaron y procesaron utilizando el software MS Workstation (V 6.9). En primer lugar, las muestras se analizaron en modo de escaneo completo adquirido en el rango m/z 50-2000.

5.5.2. Actividad Antibacteriana

Para determinar el efecto antibacteriano del extracto purificado de ruezno de pistache, se

prepararon diluciones de 187.5 a 3000 $\mu\text{g/mL}$ y se probaron contra las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella* sp. (Colección del Laboratorio de Microbiología del CIAD, Subsede Delicias). Se seleccionó el método de difusión por disco de acuerdo con lo reportado por Hameg *et al.* (2020) con modificación en el volumen utilizado. Para ello, se prepararon cajas Petri con agar nutritivo para posteriormente realizar una estría cerrada con un hisopo estéril, a una concentración de inóculo de bacteria con escala 0.5 Mc Farland (1.5×10^8 UFC/mL). Después se colocaron discos de papel filtro (Whatman No. 1) de 6 mm de diámetro impregnados con 15 μL de cada uno de los extractos, para luego incubarse a una temperatura de 35 ± 2 °C durante 24 h para observar el crecimiento del microorganismo. Se realizó un extracto de la fracción oleosa utilizando tergitol 0.04% como solvente, mientras que para la fracción obtenida en polvo se utilizó agua destilada como solvente. El control positivo en las pruebas fue Amoxicilina-Ácido clavulánico a una concentración de 30 $\mu\text{g/mL}$. El control negativo para el extracto de la fracción oleosa fue el tergitol 0.04%. Las determinaciones se realizaron por triplicado. Los halos de inhibición para la actividad antibacteriana se midieron con vernier y se reportaron en mm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Etapa 1: Potencial del Ruezno de Pistache como Soporte en Fermentación en Estado Sólido y Selección de Tiempo de Fermentación

6.1.1 Caracterización Físicoquímica del Ruezno de Pistache

Los resultados obtenidos de IAA, PCH, DE y humedad máxima del ruezno de pistache se presentan en el Cuadro 7. Para una correcta FES es necesario utilizar un soporte vegetal adecuado, por lo que cada material vegetal tiene parámetros físicoquímicos diferentes que lo pueden convertir en un candidato idóneo o no para la FES (Kumar *et al.*, 2021).

Cuadro 7. Índice de absorción de agua, humedad máxima, punto crítico de humedad y densidad de empaque del ruezno de pistache.

Parámetros	Resultados
Punto crítico de humedad (%)	0.37±0.05
Índice de absorción de agua (g gel/gms)	5.73±1.05
Humedad máxima (%)	82.79±2.77
Densidad de empaque (gms/cm ³)	0.48

g gel = gramos de gel; gms = gramos de masa seca

El PCH indica la cantidad de agua ligada que se encuentra en el material vegetal, y por lo tanto que no puede ser utilizada por el microorganismo para que lleve a cabo sus funciones metabólicas y crecimiento (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). Un PCH alto podría afectar el crecimiento del microorganismo, ya que es poca el agua libre encontrada en el material vegetal, mientras que un PCH bajo da mayor cantidad de agua libre en el soporte vegetal (López-Cárdenas *et al.*, 2023; Torres-Leon *et al.*, 2019). Para la FES, se recomienda valores menores a 40 % de PCH en el uso

de cepas de la especie *Aspergillus niger* (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). El ruezno de pistache obtuvo un PCH de $0.37 \pm 0.05\%$, lo que indica que presenta un excelente PCH para la FES, ya que se han reportado valores más altos que el obtenido para el ruezno de pistache, dichos valores de PCH eran de 16% para cáscara de coco; 12% para el bagazo de caña; 27% para mazorcas de maíz; y 29.5% para tallos de candelilla (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014), además de $3.75 \pm 0.29\%$ para vainas de cascalote (López-Cárdenas *et al.*, 2023); $46.5 \pm 2.94\%$ para semilla y endocarpio fibroso de mango (Torres *et al.*, 2019); y $4.63 \pm 1.36\%$ para residuos de higo (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2017). El ruezno de pistache mostró un PCH menor a los residuos agroindustriales reportados en los estudios anteriores, por lo que presenta menos agua ligada al material, y más agua disponible para el crecimiento microbiano.

Otro parámetro importante para definir si el material vegetal es adecuado para la FES es el IAA, el cual se define como la cantidad de agua que puede ser absorbida por el material vegetal gracias a grupos hidrofílicos que se encuentran en las moléculas del mismo (Torres-León *et al.*, 2019). Por ello, se prefieren materiales que sean capaces de absorber varias veces su peso, por lo que un rango entre 2.97 y 12.09 g gel/gms de IAA facilita el crecimiento y desarrollo del microorganismo, haciendo que presenten potencial para utilizarse en FES (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). El ruezno de pistache obtuvo un valor de IAA de 5.73 ± 1.05 g gel/gms, lo que indica una amplia capacidad de absorción de agua, comparado con el reportado para otros materiales empleados en procesos de FES, como las vainas de cascalote (2.97 ± 0.07 g gel/g ms) (López-Cárdenas *et al.*, 2023), cáscara de rambután (3.4 ± 0.01 g gel/gms) (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2022), semilla y endocarpio fibroso de mango (3.5 ± 0.04 g gel/gms) (Torres *et al.*, 2019) y residuos de higo (3.74 ± 0.10 g gel/g ms) (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2017).

La humedad máxima del material permite establecer hasta que valor de humedad es posible trabajar el proceso de FES sin que haya agua en exceso, ya que la humedad puede afectar en el intercambio gaseoso del microorganismo, y ocasionar una aglomeración de partículas (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2022). El ruezno de pistache presenta un valor máximo de humedad del $82.79 \pm 2.77\%$. Los valores obtenidos son ligeramente superiores a lo reportado por López-Cárdenas *et al.* (2023) para vainas de cascalote ($79.33 \pm 2.08\%$) y Cerdeja-Cejudo *et al.* (2022) para cáscara de rambután ($72 \pm 0.03\%$). García (2016) indica que los hongos necesitan un contenido de humedad entre el 40 y 60%, por lo que el ruezno de pistache le proporciona las condiciones óptimas a *A. niger* GH1.

La DE indica el grado de compactación del material vegetal, y para efectos de un buen proceso de

FES se buscan valores bajos que permitan tener un mejor intercambio gaseoso y mayor penetración del microorganismo en el sustrato (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2014). El ruezno de pistache presentó un valor de 0.48 g/cm^3 que indica que no presenta un alto grado de compactación.

6.1.2 Cinética de Respiración

Los datos de la cinética de respiración del crecimiento de *A. niger* GH1 sobre el ruezno de pistache se muestran en las figuras 8 y 9, así como en el cuadro 8. Se observaron las fases de crecimiento del microorganismo, donde la fase de adaptación se presentó desde el tiempo de inóculo (0 h) hasta las primeras 19 h de proceso; la fase de crecimiento exponencial se observó en el rango de 19–36 h; y la fase de mantenimiento fue a partir de las 36 h, sin observar la fase de muerte del microorganismo por el corto tiempo de fermentación.

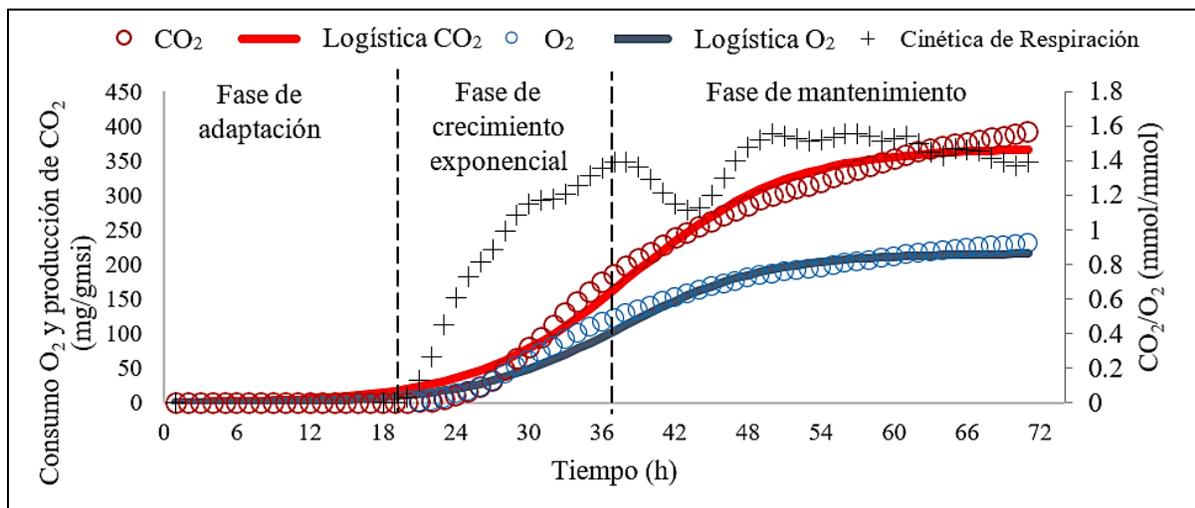


Figura 8. Cinética de producción de CO_2 ajustada al modelo Logístico como medición indirecta de crecimiento de *A. niger* GH1 en ruezno de pistache. gmsi = gramos de masa seca inicial.

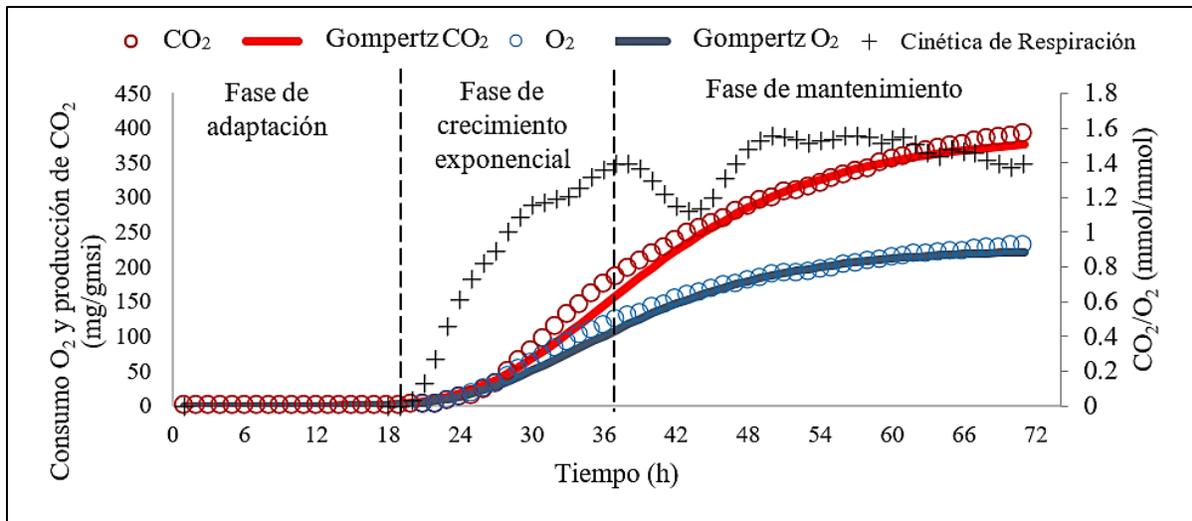


Figura 9. Cinética de producción de CO₂ ajustada al modelo Gompertz como medición indirecta de crecimiento de *A. niger* GH1 en ruezno de pistache. gmsi = gramos de masa seca inicial.

El máximo crecimiento de *A. niger* GH1 se observa entre las 50 y 60 h, que fue el tiempo en el que mayor producción de CO₂ hubo en la fermentación. Por otro lado, Méndez (2013) reportó el máximo crecimiento de *A. niger* en dulce de caña a las 48 h, sin embargo, menciona que los datos experimentales corregidos para el crecimiento de *A. niger* están cerca de las 72 h. En otro estudio, Figueroa-Montero (2011), reportó la máxima tasa de producción de CO₂ de *A. niger* a 50 h de FES con un sustrato de 70% salvado de trigo/30% harina de soya, mientras que para un soporte inerte de agrolita fue a 23 h. Estos estudios indican que el crecimiento de *A. niger* puede variar, presentando diferentes tasas máximas de producción de CO₂ gracias a los diferentes sustratos utilizados como soporte de FES. En el caso del ruezno de pistache, se observa que entre las 36 y 48 h se da una disminución en la producción de CO₂, lo cual se puede atribuir a la posible terminación de su principal fuente de carbono, sin embargo, a partir de las 42 h hay una segunda etapa de crecimiento, esto se puede adjudicar a la amplia gama de enzimas secretadas a causa de su metabolismo secundario, encontrando proteasas, lipasas, amilasas, celulasas y xilanasas por mencionar algunas (Gómez *et al.*, 2021). Estas enzimas hidrolizan diferentes compuestos orgánicos, como lípidos, proteínas o carbohidratos y obtener energía para su crecimiento y desarrollo (Costa *et al.*, 2018).

Para medir el crecimiento de *A. niger* GH1 empleando el ruezno de pistache como sustrato, se ajustaron los datos de producción de CO₂ a los modelos matemáticos Logístico y Gompertz, y los

resultados se muestran en el Cuadro 8. La ecuación del modelo Gompertz presentó el mejor ajuste a los datos ($R^2=0.9973$), ligeramente superior al obtenido con el modelo logístico (0.9917). Este resultado concuerda con lo reportado por Figueroa-Montero (2011) encontrando que el crecimiento de *A. niger* en el sustrato de 70% salvado de trigo / 30% harina de soya se ajustó mejor a la ecuación del modelo Gompertz, mientras que para el soporte inerte de agrolita fue la ecuación del modelo Logístico.

Cuadro 8. Datos obtenidos de la cinética de respiración ajustados a los modelos logístico y Gompertz.

ECUACIÓN MODELO LOGÍSTICO		
Tasa específica de crecimiento máxima μ_{max} (h^{-1})	Coficiente de determinación (R^2)	Tasa específica de crecimiento μ (h^{-1})
0.192	0.9917	0.154
ECUACIÓN MODELO GOMPERTZ		
Tasa específica de crecimiento máxima μ_{max} (h^{-1})	Coficiente de determinación (R^2)	Tasa específica de crecimiento μ (h^{-1})
0.192	0.9973	0.095

La tasa específica de crecimiento obtenida con el modelo Gompertz da un resultado de $0.095 h^{-1}$, el cual es mayor al reportado por Cueva (2017) durante el crecimiento de *A. niger* utilizando almidón de trigo como sustrato ($0.011 h^{-1}$), Fernández *et al.* (2022) empleando una cepa de *A. niger* en residuos de papa ($0.016 h^{-1}$), y Machado de Castro *et al.* (2011) empleando una cepa de *A. awamori* en residuos de babasú ($0.015 h^{-1}$). La diferencia se puede atribuir a la suplementación del medio con sales minerales que ayudan al crecimiento y desarrollo del microorganismo, puesto que se puede dirigir a ciertas rutas metabólicas y producir metabolitos secundarios como enzimas, las cuales pueden ayudar con la degradación de la pared celular y obtener energía para su desarrollo (Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2023), además de que probablemente el ruzno de pistache cumple sus requerimientos nutritivos (Costa *et al.*, 2018). El hongo *A. niger* puede utilizar glucosa y glicerol como principales fuentes de carbono, sin embargo, al encontrarse concentraciones de glucosa de 200 g/L o superiores, se puede producir una disminución en el crecimiento del microorganismo

(Reyes-Ocampo *et al.*, 2013).

6.1.3 Determinación del Contenido Fenólico y Capacidad Antioxidante

Los resultados obtenidos para el contenido de FH, FC y FT para cada tiempo de fermentación se muestran en el cuadro 9. El mayor contenido de FH y FT se obtuvo a las 24 h de fermentación con valores de 18.57 ± 0.83 mgEAG/gms y 23.83 ± 1.27 mg/gms respectivamente, mientras que el mayor contenido de FC se obtuvo a las 72 h de fermentación con un valor de 8.34 ± 1.61 mgEC/gms. El contenido de FH y FC a las 24 h de fermentación respecto al control mostró un aumento del 29.76 y 38.42 %, respectivamente. Por otro lado, el contenido de FT a las 24 h de cultivo fue 4.88% mayor al tiempo de 72 h, el cual fue el segundo valor con mayor contenido de FT, mientras que el tiempo de 36 h fue en el que menor contenido fenólico presentó, con un porcentaje 70% menor al obtenido a las 24 h.

Cuadro 9. Determinación de contenido de FH, FC y totales para cada tiempo de fermentación.

Tiempo de fermentación (h)	FH (mgEAG/gms)	FC (mgEC/gms)	FT (mg/gms)
0 (control)	14.31 ± 0.31^{de}	3.80 ± 0.16^{def}	18.11 ± 0.41^e
12	16.39 ± 0.22^b	4.49 ± 0.16^{cde}	20.88 ± 0.35^{cd}
24	18.57 ± 0.83^a	5.26 ± 0.50^c	23.83 ± 1.27^a
36	10.94 ± 0.94^{fg}	3.07 ± 0.08^{fg}	14.01 ± 0.98^g
48	15.01 ± 0.89^{bcd}	7.02 ± 0.46^b	22.03 ± 0.74^{bc}
60	12.34 ± 0.21^f	4.83 ± 0.16^{cd}	17.82 ± 1.21^{ef}
72	16.22 ± 1.62^{bc}	8.34 ± 1.61^a	22.72 ± 3.19^{ab}

Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre tiempos (LSD, $\alpha \leq 0.05$)

FH = fenoles hidrolizables; FC = fenoles condensados; FT = fenoles totales; gms = gramo de masa seca; mgEAG = miligramos equivalentes de ácido gálico; mgEC = miligramos equivalentes de catequina.

A. niger GH1 es un hongo que se caracteriza por presentar una fase de adaptación corta, reduciendo el tiempo de máximo crecimiento y la producción de algún metabolito (Orzua *et al.*, 2009).

Asimismo, durante el crecimiento el hongo es capaz de producir diversas enzimas que degradan la pared celular, liberando compuestos fenólicos ligados y otros compuestos orgánicos que pueden ser empleados como fuente de carbono para el microorganismo (Torres-León *et al.*, 2019). Se ha reportado el uso de *A. niger* GH1 en procesos de FES para recuperar compuestos fenólicos a partir de diferentes residuos como cáscara de rambután (Cerdeja-Cejudo *et al.*, 2022), semilla y endocarpio fibroso de mango (Torres-León *et al.*, 2019), rosa de castilla (De León-Medina *et al.*, 2020) y residuos de piña (Paz-Arteaga *et al.*, 2023), con la máxima liberación de FT a las 12, 20, 24 y 30 h de cultivo, respectivamente. A partir de estos datos, es posible establecer un rango de 12 a 30 h como el tiempo en que *A. niger* GH1 libera la mayor cantidad de compuestos fenólicos en procesos de FES empleando residuos agroindustriales como sustrato.

Generalmente, la FES aumenta el contenido fenólico, ya que estos compuestos se encuentran unidos a la matriz o sustrato utilizado, pasando a la fracción libre por acción de enzimas hidrolíticas generadas por el metabolismo del microorganismo, las cuales romperán sus enlaces de unión a estos componentes de la pared celular (Paz-Arteaga *et al.*, 2023).

Respecto a la CA de los extractos fermentados de ruezno de pistache, los resultados se presentan en el cuadro 10. La mayor CA se observó a las 24 h de cultivo, con valores de 84.48 ± 0.30 mgET/gms, 94.79 ± 0.89 mgET/gms y 54.02 ± 0.62 mgFe²⁺/gms para los ensayos de DPPH, ABTS y FRAP respectivamente. Los aumentos en la CA observada a las 24 h de fermentación fue de 42.43, 23.42 y 21.96 % para los ensayos ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente.

Cuadro 10. Determinación de CA del ruezno de pistache por los métodos DPPH, ABTS y FRAP para cada tiempo de fermentación.

Tiempo de fermentación	ABTS (mgET/gms)	DPPH (mgET/gms)	FRAP (mgFe ²⁺ /gms)
0 (Control)	59.31±1.59 ^c	76.80±2.83 ^c	44.29±1.59 ^b
12	69.77±0.48 ^b	81.39±0.39 ^b	44.08±0.15 ^{bc}
24	84.48±0.30^a	94.79±0.89^a	54.02±0.62^a
36	35.38±1.07 ^d	29.28±2.01 ^{ef}	19.79±1.54 ^d
48	21.99±1.36 ^f	40.00±3.60 ^d	18.02±0.81 ^e
60	19.40±1.18 ^g	20.91±1.76 ^g	11.68±0.13 ^g
72	24.67±1.56 ^e	32.00±3.08 ^e	13.89±0.66 ^f

Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre tiempos (LSD, $\alpha \leq 0.05$).
gms = gramo de masa seca; mgET = miligramos de equivalentes trolox.

La correlación de Pearson obtenida para las diferentes variables de respuesta en la presente etapa del proyecto (Cuadro 11) indica que existe una relación lineal positiva regular entre el contenido de FH y la CA para los 3 métodos medidos (DPPH, ABTS y FRAP) ($r \leq 0.6902$) siendo estos estadísticamente significativos ($\alpha \leq 0.05$), lo que nos señala que al aumentar el contenido de FH también lo hace la CA.

Los valores de correlación obtenidos para FC y FH, afectó la correlación de los FT con la CA, puesto que, para obtener esta variable de respuesta se hace la suma de FC y FH, por ello al obtener valores de correlación negativos en FC, la correlación de FT disminuiría en comparación a la de FH, quién presentó la fuerza de correlación más alta de los dos tipos de CF.

Cuadro 11. Coeficiente de correlación de Pearson entre las variables de respuesta FH, FC, FT, DPPH, ABTS y FRAP.

Variables medidas	FH	FC	FT	DPPH	ABTS	FRAP
FH	-	0.4811*	0.9058*	0.6902*	0.5929*	0.5881*
FC		-	0.8071*	-0.2210	-0.3634	-0.3580
FT			-	0.3579	0.2236	0.2230
DPPH				-	0.9600*	0.9839*
ABTS					-	0.9807*
FRAP						-

* = significativo ($\alpha \leq 0.05$); FH = fenoles hidrolizables; FC = fenoles condensados; FT = fenoles totales.

Álvarez y Lock (1992) informaron que los FH se destacan por sus propiedades antioxidantes, mientras que los FC lo hacen por su actividad bacteriostática y fungicida, sin embargo, Vázquez-Flores *et al.*, (2012) menciona la actividad antioxidante para ambos grupos de CF.

El valor de correlación de Pearson presentado para FT y DPPH ($R=0.35$) indica una correlación lineal positiva entre las dos variables de respuesta. Ramírez-Esparza *et al.* (2024), Buenrostro-Figueroa *et al.* (2023), López-Cárdenas *et al.* (2023) y Torres-León *et al.* (2019) reportaron también una correlación lineal positiva entre FT y DPPH para granos de maíz ($R = 0.78$), cáscara de granada ($R=0.86$), vainas de cascalote ($R=0.95$) y semilla-endocarpio fibroso de mango ($R=0.97$), respectivamente. Para las variables de respuesta de FT y ABTS, se presentó una correlación lineal

positiva ($R=0.22$). Ramírez-Esparza *et al.* (2024) y López-Cárdenas *et al.* (2023) reportaron una correlación lineal positiva entre FT y ABTS para granos de maíz ($R=0.77$) y vainas de cascalote ($R=0.95$), respectivamente. En cuanto a las variables de respuesta de FT y FRAP, se obtuvo una correlación lineal positiva ($R=0.22$). Ramírez-Esparza *et al.* (2024) y López-Cárdenas *et al.* (2023) indican una correlación lineal positiva entre FT y FRAP para granos de maíz ($R=0.88$) y vainas de cascalote ($R=0.85$), respectivamente.

La fuerza de asociación en el presente proyecto ($R=0.36$) para FT con las variables de respuesta de CA indica que los CF liberados por el proceso de FES tienden a tener poca actividad antioxidante u alguna otra bioactividad, pues presentan una correlación lineal positiva débil, donde se observa que al incrementar los CF también aumenta la CA, sin embargo, al ser coeficiente cercano a cero, puede significar la poca o casi inexistencia de relación entre ambas.

Diversos estudios de FES tienen como objetivo la obtención de los CF con CA. En la mayoría de los casos aumenta la CA cuando hay un mayor contenido fenólico, dado que estos compuestos actúan como donadores de electrones y captan radicales libres (Ibarra-Cantún *et al.*, 2022). Torres-León *et al.*, (2019) reportan que la FES incrementa la CA en semilla y endocarpio fibroso de mango por la liberación de los CF, señalando que la cantidad de estos es proporcional a la actividad antioxidante a las 24 h de proceso; López-Cárdenas *et al.*, (2023) reportan que la FES aumentó el contenido fenólico y la actividad antioxidante en vainas de cascalote molida a las 12 h de proceso; Cerda-Cejudo *et al.*, (2022) indican que en cáscara de rambután el tiempo de mayor contenido fenólico total coincide con el tiempo de la mayor CA. Sin embargo, Paz-Arteaga *et al.*, (2023) reportan que el tiempo de mayor CF no coincide con el de mayor CA, ya que la mayor liberación de CF se presentó a las 32 h y la mayor CA a las 8 h de proceso. Esto se puede deber a que los CF presentes en el residuo no presentan muchos anillos fenólicos, por lo que hay menos grupos hidroxilo, los cuales son los encargados de proveer la actividad antioxidante a estos compuestos (Peñarrieta *et al.*, 2014).

En el presente estudio se observa que la mayor CA coincide con el mayor contenido fenólico a las 24 h de proceso, por lo que se confirma que estos compuestos liberados en ruezno de pistache aumentan la CA. Dados los resultados obtenidos en la presente etapa, se ha seleccionado el tiempo de 24 h para realizar los procesos de fermentación a tiempo final.

6.2 Etapa 2: Efecto de la Fermentación en Estado Sólido con *A. niger* sobre la Liberación de Compuestos Fenólicos y Capacidad Antioxidante a partir de Ruezno de Pistache.

En esta etapa se evaluó la liberación de CF a 24 h de proceso, variando los niveles de humedad, concentración de inóculo y aireación (Cuadro 12).

Cuadro 12. Condiciones de humedad, concentración de inóculo y aireación para cada tratamiento.

Tratamiento	Humedad (%)	Inóculo (esp/mL)	Aireación (VKgm)
Control	50%	0	0
T1	60%	5x10 ⁶	0.5
T2	40%	5x10 ⁶	0.5
T3	50%	1x10 ⁶	0.5
T4	50%	1x10 ⁷	0.5
T5	40%	1x10 ⁷	1
T6	60%	1x10 ⁷	1
T7	40%	1x10 ⁷	1
T8	60%	1x10 ⁷	1
T9	40%	5x10 ⁶	1.5
T10	60%	5x10 ⁶	1.5
T11	50%	1x10 ⁶	1.5
T12	50%	1x10 ⁷	1.5
T13	50%	5x10 ⁶	1
T14	50%	5x10 ⁶	1
T15	50%	5x10 ⁶	1

VKgm = Volumen por kilogramo de masa

Los resultados obtenidos en el exploratorio muestran aumento en el contenido de fenoles en todos los tratamientos respecto al control sin fermentar (Cuadro 13), encontrando que el tratamiento 8 presentó las mejores condiciones (60% de humedad, 1x10⁷ esp/mL y 1 VKgm de aireación) con valores de 34.71±1.04 mgEAG/gms, 6.77±0.28 mgEC/gms y 41.48±0.99 mg/gms para FH, FC y FT, respectivamente. El aumento del contenido fenólico total del tratamiento 8 respecto al control de ruezno de pistache sin fermentar era de 129%. El tratamiento 1 (60% de humedad, 5x10⁶ esp/mL

y 0.5 VKgm de aireación) es el segundo mejor tratamiento, con un valor de 37.03 ± 2.21 mg/gms para FT, y al compararlo con el tratamiento 8, solamente se observa una diferencia del 12%. Por otro lado, el tratamiento 7 (40% de humedad, 1×10^7 esp/mL y 1 VKgm de aireación) que obtuvo el menor aumento con un valor de 28.58 ± 0.44 mg/gms, observando un valor 45% menor respecto al tratamiento 8. Con estos resultados se evidencia que el ruezno de pistache contiene mayor contenido de FH que de FC. Esto se puede explicar por la estructura del ruezno de pistache, que, al ser un residuo agroindustrial, presenta una gran cantidad de moléculas orgánicas como pectina o carbohidratos estructurales como celulosas, hemicelulosas o lignina (Cano y Póstigo *et al.*, 2021), y por esta razón habrá una mayor fracción de CF unidos con estos compuestos orgánicos que aquellos que crean polímeros de flavonoides como lo son los FC (Vázquez-Flores *et al.*, 2012).

Cuadro 13. Determinación de contenido de FH, FC y totales para cada tratamiento.

Tratamiento	FH (mgEAG/gms)	FC (mgEC/gms)	FT (mg/g ms)
Control	14.31 ± 0.31^f	3.80 ± 0.16^f	18.11 ± 0.41^h
T1	30.16 ± 1.65^b	6.87 ± 0.59^a	37.03 ± 2.21^b
T2	24.88 ± 1.30^{de}	4.66 ± 0.39^e	29.54 ± 1.65^{fg}
T3	28.10 ± 0.84^c	6.61 ± 0.03^a	34.71 ± 0.84^{cd}
T4	31.03 ± 0.06^b	5.78 ± 0.02^b	36.81 ± 0.05^b
T5	26.04 ± 0.52^{de}	4.20 ± 0.30^f	30.24 ± 0.24^{efg}
T6	27.69 ± 1.19^c	5.61 ± 0.32^{bc}	33.30 ± 1.50^d
T7	24.79 ± 0.35^{de}	3.78 ± 0.18^f	28.58 ± 0.44^g
T8	34.71 ± 1.04^a	6.77 ± 0.28^a	41.48 ± 0.99^a
T9	26.13 ± 0.37^d	4.05 ± 0.34^f	30.19 ± 0.57^{efg}
T10	24.91 ± 0.29^{de}	6.49 ± 0.25^a	31.40 ± 0.51^e
T11	28.53 ± 1.05^c	4.82 ± 0.15^{de}	33.35 ± 1.19^d
T12	24.64 ± 0.96^e	5.83 ± 0.20^b	30.47 ± 0.94^{ef}
T13	31.02 ± 0.72^b	5.21 ± 0.04^{cd}	36.23 ± 0.69^{bc}
T14	30.70 ± 0.43^b	4.67 ± 0.14^e	35.37 ± 0.31^{bc}
T15	30.83 ± 0.04^b	4.98 ± 0.04^{de}	35.81 ± 0.07^{bc}

Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (LSD, $\alpha \leq 0.05$) FH = fenoles hidrolizables; FC = fenoles condensados; FT = fenoles totales; gms = gramo de masa seca; mgEAG = miligramos equivalentes de ácido gálico; mgEC = miligramos equivalentes de catequina.

Existen solo dos reportes de procesos de FES empleando el ruezno de pistache como sustrato. Abbasi *et al.*, (2007) realizaron una FES a 30°C y 70% de humedad durante 20 días, empleando el

hongo *Phanerochaete chrysosporium*. El máximo contenido fenólico se obtuvo a los 16 días [63 mgCAE/gms (Equivalentes de ácido cafeico)], lo cual representa un aumento del 29% con respecto al control. Si bien no son las mismas unidades, el valor es mayor a los 41.48 mgEAG/gms obtenido en el presente proyecto. No obstante, los autores reportan la adición de soya como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo, lo cual puede sobreestimar el valor del contenido de CF, ya que la soya contiene de 10.3 a 13.7 mg/g (Król-Grzymała y Amarowicz, 2020). Karimi *et al.*, (2010) reportaron la FES de ruezno de pistache durante 10 días a 30°C y 66% de humedad inicial, empleando el hongo *A. terreus* ATCC 74135 (1×10^6 esp/gms). A diferencia de otros estudios, los autores reportaron una disminución de 81.5% en el contenido fenólico total, respecto al control sin fermentar, atribuida a una posible hidrólisis al emplear HCl 6 M durante la extracción o bien, al consumo de los CF por el hongo, ya que al ser una fermentación de larga duración, se consume la fuente de carbono y el microorganismo puede secretar enzimas capaces de degradar los CF y utilizarlos como fuente de carbono para llevar a cabo sus acciones metabólicas (Torres-León *et al.*, 2019).

Se han realizado estudios acerca de la extracción de CF a partir del ruezno de pistache empleando diversas técnicas de extracción, con valores de 22.2 a 127.25 mg/gms (Elhadeh *et al.*, 2021; Erşan *et al.*, 2018; Grace *et al.*, 2016; Neval-Özbek *et al.*, 2019; Neval-Özbek *et al.*, 2018; Noorolahi *et al.*, 2019; Pakdaman *et al.*, 2021). Las diferencias en el contenido fenólico se atribuyen al método de extracción, solvente empleado, tiempo, temperatura y relación solido/solvente, así como al cultivo, ubicación geográfica, temporada de cosecha o la misma variedad del pistache (Elhadeh *et al.*, 2021; Neval-Özbek *et al.*, 2019; Pakdaman *et al.*, 2021). No obstante, los resultados obtenidos en el presente proyecto son superiores a lo reportado por Erşan *et al.*, (2018), Neval-Özbek *et al.*, (2018) y Noorolahi *et al.*, (2019) demostrando la efectividad del bioproceso como estrategia para incrementar el contenido de CF a partir del ruezno de pistache.

En el presente estudio se logró un incremento de 129 % en el contenido de FT por efecto de la FES con *A. niger*. Diversos estudios han demostrado el efecto positivo de la FES con *A. niger* GH1 sobre el contenido de CF a partir de diversos sustratos vegetales. De León-Medina *et al.*, (2020) reportaron un 166% de aumento en el CF en extractos fermentados por *A. niger* GH1 a partir de rosa castilla. Torres-León *et al.*, (2019) incrementaron el contenido de FT un 230% en semilla y endocarpio fibroso de mango utilizando *A. niger* GH1. Durante el proceso de FES de cáscara de rambután mexicano con *A. niger* GH1, Cerda-Cejudo *et al.*, (2022) obtuvieron un aumento del

contenido de FT del 404%. López-Cárdenas *et al.*, (2023) incrementaron el contenido de FT un 219% en vainas de cascalote molido utilizando *A. niger* GH1; Buenrostro-Figueroa *et al.*, (2023) lograron un aumento de ~526% en cáscara de granada utilizando *A. niger* GH1; y Ramírez-Esparza *et al.*, (2024) incrementaron el contenido de FT un 83% en maíz con el hongo *R. oryzae*. Utilizando la cepa *A. niger* HT4 en FES de residuos de higo, Buenrostro-Figueroa *et al.*, (2017) reportaron un aumento en FT del 548%. El incremento del contenido fenólico se debe a que durante el proceso de FES, el microorganismo produce enzimas como celulasas, lipasas, proteasas y amilasas que se encargan de degradar componentes de pared celular, liberando así la fracción ligada de CF, que pasan a la fracción libre mejorando su solubilidad y extractabilidad (Brück *et al.*, 2022; Buenrostro-Figueroa *et al.*, 2023; Cerda-Cejudo *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2018; De León-Medina *et al.*, 2020; Gómez *et al.*, 2021; López-Cárdenas *et al.*, 2023; Paz-Arteaga *et al.*, 2023; Ramírez-Esparza *et al.*, 2024; Torres-León *et al.*, 2019).

Debido a la fuerte correlación entre los CF y la CA, el mayor aumento en esta también se observó en el tratamiento 8 (60% de humedad, 1×10^7 esp/mL y 1 VKgm de aireación) con valores de 132.75 ± 4.91 mgET/gms y 131.68 ± 2.49 mgET/gms para DPPH y ABTS, respectivamente. En el caso de la CA frente al ensayo FRAP, no se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el tratamiento 1 y el 8, con valores de 532.96 ± 29.98 y 504.59 ± 8.71 mgFe²⁺/gms, respectivamente. Por lo tanto, el tratamiento 8 permitió el mayor aumento en la CA en los tres métodos, con incrementos del 124, 71 y 1039% (ABTS, DPPH y FRAP, en ese orden), respecto al control sin fermentar. Los incrementos en la CA se atribuyen a que el tratamiento 8 presentó el mayor contenido de FT (Cuadro 14), los cuales al ser de naturaleza antioxidante incrementan dicha propiedad biológica (Vázquez-Flores *et al.*, 2012).

Cuadro 14. Capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP) en extractos de ruezno de pistache sometidos a FES con *A. niger* GH1.

Tratamiento	ABTS (mgET/gms)	DPPH (mgET/gms)	FRAP (mgFe ²⁺ /gms)
Control	$59.31 \pm 1.59^{h*}$	76.80 ± 2.83^{gh}	44.29 ± 1.59^j
T1	110.03 ± 5.43^c	104.20 ± 0.87^c	532.96 ± 29.98^a
T2	91.65 ± 1.98^{ef}	82.89 ± 3.41^f	424.01 ± 24.74^{bc}
T3	98.37 ± 6.20^d	83.94 ± 7.79^f	385.70 ± 10.58^{de}
T4	95.09 ± 7.05^{de}	113.43 ± 3.18^b	355.63 ± 2.30^{ef}
T5	83.39 ± 4.16^g	85.84 ± 2.76^{ef}	273.25 ± 22.02^i

T6	118.90±2.79 ^b	107.97±4.46 ^c	427.83±13.38 ^{bc}
T7	91.84±4.45 ^{def}	89.74±1.29 ^e	288.28±19.06 ^{hi}
T8	132.75±4.91 ^a	131.68±2.49 ^a	504.59±8.71 ^a
T9	96.50±0.79 ^{de}	85.34±2.24 ^{ef}	326.47±4.83 ^{fg}
T10	88.13±0.68 ^{fg}	76.25±2.43 ^{gh}	314.48±18.94 ^{gh}
T11	116.09±3.38 ^{bc}	97.24±1.29 ^d	411.80±33.53 ^{cd}
T12	91.18±3.02 ^{ef}	71.29±2.91 ^h	328.71±2.77 ^{fg}
T13	113.86±3.02 ^{bc}	82.39±0.87 ^f	441.93±33.27 ^{bc}
T14	112.91±3.72 ^{bc}	83.86±1.86 ^f	429.75±3.72 ^{bc}
T15	110.95±2.61 ^c	81.01±2.06 ^{fg}	452.59±39.72 ^b

*Letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre tiempos (LSD, $\alpha \leq 0.05$); gms = gramo de masa seca; mgET = miligramos de equivalentes trolox; mgFe²⁺ = miligramos equivalentes de ión ferroso.

Contrario a lo obtenido en el presente estudio, se ha reportado una disminución en la CA de extractos fermentados de ruezno de pistache frente al radical DPPH. Durante la FES con *A. terreus* ATCC74135, Karimi *et al.* (2010) observaron una disminución del 9% después de 10 días de cultivo. Al someter el ruezno a FES con *P. chrysosporium* durante 16 días, se presentó una reducción del 22% en la CA (Abbasi *et al.*, 2007). Esta disminución se puede atribuir a la biodegradación y/o biotransformación de los CF, que conlleva al consumo o modificación de estos, afectando así la CA (Torres-León *et al.* 2019).

Se han realizado estudios sobre la CA del ruezno de pistache, con valores de 127.65 a 411.98 mgET/gms, de 117.64 a 466.73 mgET/gms y 122.64 a 2,230.8 mgEFe²⁺/gms para DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente (Erşan *et al.*, 2018; Noorolahi *et al.*, 2020). No obstante, los resultados obtenidos en el presente proyecto son superiores a lo reportado por Erşan *et al.* (2018), demostrando la efectividad del bioproceso como estrategia para incrementar los CF con CA del ruezno de pistache.

Estudios previos han reportado que la FES promueve un aumento en la CA en extractos obtenidos a partir de diversas matrices vegetales. López-Cárdenas *et al.*, (2023) incrementaron la CA en un 66.76, 93 y 55.67% para DPPH, ABTS y FRAP en vainas de cascalote. Buenrosto-Figueroa *et al.*, (2023) lograron un aumento de 581% para DPPH en cáscara de granada. Recientemente, Ramírez-Esparza *et al.*, (2024) reportaron un incremento del 55, 119 y 125% (ABTS, DPPH y FRAP, respectivamente) en maíz.

Los efectos que ejercen los factores sobre la liberación del CF y la CA se muestran en el Cuadro 15. En la actualidad se evalúan diferentes condiciones a la hora de realizar un proceso de FES,

entre los factores más comunes se encuentran la temperatura, humedad, concentración de inóculo, sales del medio, pH, entre otros, encontrando información de los efectos ocasionados sobre la generación de productos de interés (Herrera, 2021; Kumar *et al.*, 2020).

Cuadro 15. Efecto de la humedad, inóculo y aireación sobre el contenido de FH, FC, FT y la CA (DPPH, ABTS y FRAP) de extractos fermentados de ruezno de pistache.

Factor/Variables medidas	FH	FC	FT	ABTS	DPPH	FRAP
Humedad (%)	+	+	+	+	+	+
Inóculo (esp/mL)	+	+ ^{NS}	+	- ^{NS}	+	- ^{NS}
Aireación (VKgm)	-	-	-	- ^{NS}	-	-

$\alpha = 0.05$

^{NS} = No significativo

El contenido de humedad mostró un efecto positivo para todas las variables de respuesta, el cual fue estadísticamente significativo ($\alpha \geq 0.05$). El efecto lineal muestra que, al aumentar la humedad en el proceso de FES, también aumentará el contenido de fenoles y la CA. Se conoce que las diferentes especies microbianas estudiadas en procesos de FES requieren diferentes contenidos de humedad para poder realizar su desarrollo y una correcta liberación de CF (Buenrostro *et al.*, 2023; Cerda-Cejudo *et al.*, 2023). En procesos de FES con hongos, se recomienda un contenido de humedad del 20 al 70% (Herrera, 2021), ya que por encima del 70 % se puede afectar el crecimiento del microorganismo y la producción de enzimas, así como las propiedades físicas del sustrato provocando una mayor aglomeración de partículas y limitando la transferencia de oxígeno (De León-Medina *et al.*, 2020; López-Cárdenas *et al.*, 2023; Orzúa *et al.*, 2009). Por otro lado, valores de humedad debajo del 20% inducen a la esporulación (Kumar *et al.*, 2020), esto debido a la poca agua disponible que se encuentra en el medio, por lo que el microorganismo busca perpetuarse y dejar de crecer, para que cuando las condiciones de humedad sean de nuevo favorables, continuar con su crecimiento y desarrollo (Cañedo y Ames, 2004).

Se ha reportado el efecto de la humedad sobre el crecimiento de *A. niger* GH1 y la recuperación de compuestos bioactivos. López-Cárdenas *et al.* (2023) evaluaron la FES de vainas de cascalote a dos niveles de humedad (50 y 60%). Se observó un efecto positivo, con una mayor obtención de

FT y CA al 60%. Por otra parte, Cerda-Cejudo *et al.* (2022) evaluaron el efecto de la humedad (50, 60 y 70%) en un proceso de FES con *A. niger* GH1 sobre cáscara de rambután mexicano. Los autores observaron un efecto positivo cuadrático, es decir, que el incremento en el contenido de humedad favorece la recuperación de ácido elágico hasta cierto punto, alcanzando el máximo valor al 60% de humedad, y por encima de este (70%) el valor disminuye. Al evaluar dos niveles de humedad (50 y 60%), Buenrostro *et al.* (2023) observaron un efecto contrario durante la FES con *A. niger* GH1 sobre cáscaras de granada, estableciendo el 50% de humedad como valor óptimo para la liberación de los FT. Los estudios de López-Cárdenas *et al.* (2023) y Cerda-Cejudo *et al.* (2022) concuerdan con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que se obtuvo un contenido de 60% de humedad utilizando la especie *A. niger* GH1 al igual que en los estudios anteriormente mencionados. Este contenido de humedad del 60% es el valor requerido para el proceso de FES del ruezno de pistache, y debido a que cada material vegetal presenta diferente composición fisicoquímica, las condiciones de humedad utilizadas para cada bioproceso será diferente (Martínez-Ávila *et al.*, 2013).

La concentración de inóculo mostró un efecto positivo significativo para la mitad de las variables de respuesta ($\alpha \geq 0.05$). Por ello, al aumentar la concentración de inóculo se favorece el contenido de FH, FT y la CA frente al radical DPPH. En el caso de los ensayos de ABTS y FRAP, no se observó un efecto significativo, así como para FC. Al ser un parámetro importante durante un proceso de FES, el inóculo ha sido estudiado ampliamente, ya que de ello depende el éxito del proceso. La concentración adecuada de inóculo permite reducir la fase de adaptación del microorganismo, acelerando el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos secundarios, reduciendo los tiempos de fermentación para obtener el producto de interés (Kumar *et al.*, 2020; Waites *et al.*, 2001). El uso de hongos filamentosos se atribuye a su capacidad de adaptarse a una gran variedad de sustratos y fuentes de carbono, gracias a enzimas hidrolíticas que produce, y adicionalmente, contribuyen a la liberación o bioconversión de CF (López-Cárdenas *et al.*, 2023).

Tal como se observó en este estudio, se ha reportado que el incremento en la concentración de inóculo promueve una mayor liberación de CF mediante FES con *A. niger* GH1 a partir de cáscara de rambután, rosa de castilla y vainas de cascalote (Cerda-Cejudo *et al.*, 2022; De León-Medina *et al.*, 2020 y López-Cárdenas *et al.*, 2023). Los resultados mostrados para la cepa *A. niger* GH1 demuestran una mayor eficiencia en la liberación de CF empleando altas concentraciones de

inóculo, lo cual se traduce a una mayor generación o síntesis de enzimas que liberan estos compuestos (Costa *et al.*, 2018).

La aireación durante el proceso de FES mostró un efecto negativo significativo ($\alpha \geq 0.05$) ante todas las variables de respuesta, excepto CA (ABTS). Al aumentar la aireación, se observó una reducción en los CF y la CA (DPPH y FRAP). La aireación juega un rol importante en la remoción de calor y CO₂ del medio, los cuales son producto del metabolismo microbiano. Asimismo, suministra el oxígeno requerido por el microorganismo para su crecimiento y desarrollo (Casciatori y Thoméo, 2018; Jachimowicz *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2018). No existen reportes del efecto de la aireación en un proceso de FES sobre la liberación de CF. Sin embargo, se ha evaluado su efecto sobre la producción de biomasa y diversas enzimas. Méndez-González *et al.*, (2020) evaluaron cinco niveles de aireación (0.16, 0.33, 0.66, 0.96 y 1.28 VKgm) sobre la producción de conidios de *Metarhizium robertsii*, obteniendo el valor más alto empleando el nivel más bajo (0.33 VKgm). Ridder *et al.* (1999) reportaron la producción de xilanasas de *Trichoderma longibrachiatum* a tres niveles de aireación (0, 2.9 y 5.7 VKgm), con la mayor actividad enzimática a 2.9 VKgm. Por otra parte, Zhou *et al.* (2018) concluyen que la producción de glicoproteína de *Streptomyces kanasensis* ZX01 aumenta a medida que se incrementa la aireación, con el mayor valor a una tasa de aireación de 2.0 vvm (volumen de aire por litro por minuto, similar a VKgm). De acuerdo con lo anterior, cada proceso de FES es único, y, por tanto, la tasa de aireación dependerá del producto que se desea obtener, el sustrato y el microorganismo empleado.

Esta disminución en los FT y CA se puede explicar por la posible captación de radicales libres dada por los CF generados por el proceso de FES (Venereo, 2002).

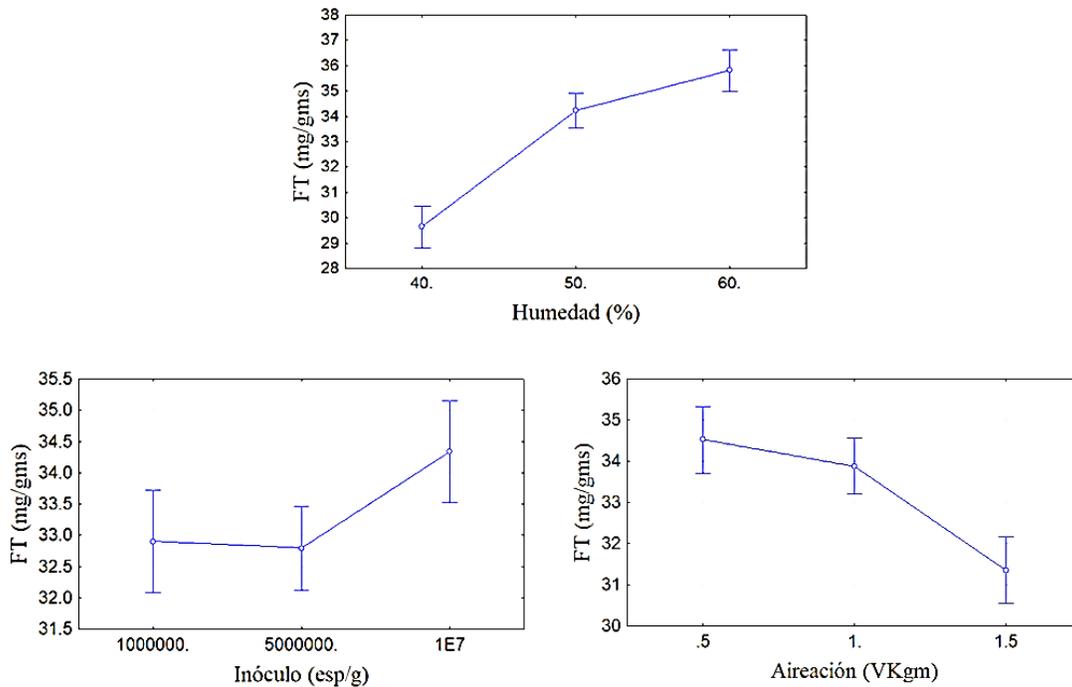


Figura 10. Efectos de contenido de humedad, concentración de inóculo y suministro de aireación sobre la liberación de FT.

Con base en los resultados obtenidos, el tratamiento 8 presenta el mejor rendimiento en cuanto a la recuperación de CF a partir del ruezno de pistache mediante FES con *A. niger* GH1 respecto al control sin fermentar, donde se refleja un incremento del 129, 142 y 78% para las variables de respuesta FT, FH y FC, respectivamente. En cuanto a la CA obtenida después del proceso de FES, se obtuvo un aumento del 72, 124 y 1,039% para las variables de respuesta DPPH, ABTS y FRAP, respectivamente.

De forma general, el proceso de FES de ruezno de pistache con *A. niger* GH1 requiere condiciones de humedad alta (60%), una concentración de inóculo elevada (1×10^7 esp/gm) y una tasa de aireación reducida (0.5 VKgm) (Figura 10) para potenciar el rendimiento de CF con CA en el ruezno de pistache.

6.3 Etapa 3: Potencial Antibacteriano del Extracto de Ruezno de Pistache Fermentado.

En esta etapa, se realizó una FES a mayor volumen bajo las mejores condiciones seleccionadas en

la etapa anterior (60% de humedad, inóculo de 1×10^7 esp/gms y aireación de 0.5 VKgm por minuto). Una vez obtenido el extracto, se sometió a una purificación mediante cromatografía en columna, y se determinó el perfil de CF y la capacidad antibacteriana de la fracción rica en CF del ruezno de pistache fermentado.

6.3.1 Perfil de Compuestos Fenólicos

A partir de la cromatografía en columna con la resina amberlita XAD-16 se obtuvieron dos fracciones, un polvo hidrosoluble y una fracción oleosa. La fracción hidrosoluble se inyectó al HPLC-MS, detectando la presencia de dos masas (330.9 y 950.5 m/z), que corresponden al ácido gálico 4-o-glucósido y la geranina. Los resultados se muestran en el Cuadro 16.

Cuadro 16. Perfil de CF de ruezno de pistache purificado.

Tiempo de retención	Masa [M-H]- (M/Z)	Compuesto	Grupo
5.69	330.9	Ácido gálico 4-O-glucósido	Ácidos hidroxibenzoicos
19.31	950.5	Geranina	Elagitaninos

El ácido gálico 4-O-glucósido ya se ha reportado ampliamente, ya que Moreno-Rojas *et al.* (2022), Arjeh *et al.* (2020), Ghandahari *et al.* (2018) y Grace *et al.* (2016) lo reportan como uno de los CF mayoritarios en el ruezno de pistache. Este compuesto es el de menor peso molecular de todos los CF y presenta actividad antioxidante (al ser donador de electrones o átomos de hidrógeno) y actividad antibacteriana al aumentar la permeabilidad de las membranas en bacterias (Arjeh *et al.*, 2020; Ghandahari *et al.*, 2018) y los cambios que provoca en el pH (Elhadeh *et al.*, 2021). En el caso de la geranina, también presenta actividad antioxidante gracias a su capacidad de captar radicales, potencial anticancerígeno ya que impide la proliferación de células cancerosas, actividad citoprotectora al generar una fuerte barrera que puede proteger los diferentes tejidos del cuerpo humano y actividad antibacteriana (Cheng *et al.*, 2016). Estos compuestos obtenidos, son responsables de la CA observada en los extractos de ruezno de pistache. Sin embargo, en el presente

estudio también se obtuvo una fracción oleosa que puede contener otro tipo de CF. Arjeh *et al.* (2020), Grace *et al.* (2016) y Schulze *et al.* (2015) reportaron la presencia de lípidos fenólicos en el ruezno de pistache, los cuales presentan su anillo aromático con una larga cadena alifática, que les otorga propiedades biológicas. Estos lípidos fenólicos son conocidos como ácidos anacárdicos, y por la fracción oleosa obtenida durante la cromatografía, se puede deducir que se trata de este tipo de CF. Estos CF se clasifican dentro de los ácidos fenólicos, siendo un carácter taxonómico, ya que solamente lo presentan las especies vegetales pertenecientes a la familia de las Anacardiáceas (Arjeh *et al.*, 2020).

6.3.2 Potencial Antibacteriano

El efecto antibacteriano del extracto purificado de ruezno de pistache fermentado sobre *E. coli* ATCC25922, *Salmonella* sp. y *S. aureus* a diferentes concentraciones de extracto tanto oleoso como acuoso se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Efectos del extracto acuoso y oleoso de ruezno de pistache en discos de 6 mm a diferentes concentraciones sobre *E.coli*, *Salomonella* sp. y *S. aureus*.

Concentración de Extracto	<i>E. coli</i> ATCC25922		<i>Salmonella</i> sp.		<i>S. aureus</i>	
	Acuoso	Oleoso	Acuoso	Oleoso	Acuoso	Oleoso
187.5 µg/mL	6.00 mm	6.00 mm	6.00 mm	ND	6.00 mm	6.00 mm
375 µg/mL	6.00 mm	6.00 mm	6.00 mm	ND	6.00 mm	6.00 mm
750 µg/mL	6.00 mm	6.00 mm	6.00 mm	ND	6.00 mm	6.00 mm
1,500 µg/mL	6.00 mm	6.00 mm	6.00 mm	ND	7.36 mm	13.16 mm*
3,000 µg/mL	6.00 mm	6.00 mm	6.00 mm	ND	7.96 mm	14.60 mm*
Antibiótico 30 µg/mL	10.80 mm	9.40 mm	11.90 mm	ND	19.03 mm	18.00 mm
Tergitol 0.04% (v/v)	ND	6.00 mm	ND	ND	ND	6.00 mm

ND = No determinado; * = Presencia de colonias bacterianas en halo de inhibición; Las mediciones incluyen el diámetro de los discos (6.00 mm).

Los resultados obtenidos en las bacterias Gram (-) *E. coli* ATCC 25922 y *Salmonella* sp. para las fracciones oleosa y acuosa demuestran que las fracciones purificadas del ruezno de pistache no tienen ningún efecto sobre miembros de este grupo de bacterias al menos a 3, 000 µg/mL. Por otro

lado, en la bacteria Gram (+) *S. aureus* se presentaron halos de inhibición en las dos fracciones de extracto. Los discos impregnados con extracto acuoso a 1, 500 y 3, 000 µg/mL presentaron un halo de inhibición de 7.37 y 7.96 mm, respectivamente; mientras que los discos impregnados con extracto oleoso mostraron un halo de inhibición de 13.16 y 14.6 mm a concentraciones de 1,500 y 3,000 µg/mL. No obstante, dentro de los halos de inhibición se observó un reducido crecimiento de colonias.

Se han realizado diferentes estudios sobre bacterias Gram (-) y Gram (+) utilizando extractos de ruezno de pistache. Rajaei *et al.* (2010) realizaron pruebas con cultivos de *Bacillus cereus* PTCC 1015, *S. aureus* PTCC 1431, *E. coli* PTCC 1330, *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1430, *Salmonella typhi* PTCC 1609, *Candida albicans* PTCC 5027 y *Neurospora intermedia* PTCC 5291. Los autores reportan que las bacterias Gram (+) fueron más sensibles que las Gram (-) ante una muestra de extracto purificado con un cartucho C18 Sep-Pak, a una concentración de 1, 200 µg/caja obteniendo halos de inhibición de 12.6 y 11.7 mm para *B. cereus* y *S. aureus* respectivamente, mientras que para las demás cepas no se presentó inhibición. En otro estudio, Elhadeif *et al.*, (2021) probaron la efectividad de un extracto de ruezno de pistache contra el crecimiento de *S. aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *B. cereus* ATCC 14579, *S. enterica* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 8739 y *P. aeruginosa* ATCC 49129. A una dosis de 10, 000 µg/mL de extracto, obtuvieron halos de inhibición de 14.25-18.66 mm para *S. aureus*, 13.83-16 mm para *S. entérica* y 13-15.25 mm para *E. coli*. El aceite esencial de ruezno de pistache presentó una concentración mínima inhibitoria de 7, 110 µg/mL contra *S. aureus* (Cepas ATCC 6538P, MRSA y ATCC 43300), *E. coli* ATCC 10536 y *P. aeruginosa* ATCC 9027) (Smeriglio *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos en el presente proyecto coinciden con los resultados obtenidos por Elhadeif *et al.* (2021) y Rajaei *et al.* (2010), donde también reportan mayor sensibilidad de la bacteria Gram (+) *S. aureus* que las bacterias Gram (-) *Salmonella* sp. y *E. coli* al ser expuestas al extracto del ruezno de pistache.

Este efecto positivo frente a las bacterias Gram (+) se debe principalmente a la composición de la pared celular (Elhadeif *et al.*, 2021; Rajaei *et al.*, 2010; Smeriglio *et al.*, 2017), ya que poseen una membrana citoplasmática rodeada de una capa gruesa de peptidoglicano que puede ser permeable por los CF, contrario a la pared celular de las bacterias Gram (-), que es más compleja al poseer una capa extra de lipopolisacáridos y lipoproteínas que recubren una delgada capa de

peptidoglicano y la membrana citoplasmática (Cuervo-Parra *et al.*, 2023). Al tener grupos hidroxilo en sus anillos fenólicos, los CF pueden interaccionar con carbohidratos y proteínas (conformación del peptidoglicano en bacterias) presentando toxicidad al aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática de las bacterias Gram (+) y alterarla por la formación de complejos con los aminoácidos de su capa de peptidoglicano (Domingo y López-Brea, 2003). Por otro lado, aceites esenciales (como los ácidos anacárdicos) también pueden interaccionar con componentes de pared celular en bacterias Gram (-) en la capa externa de glucolípidos y lipoproteínas, pero para que esto se lleve a cabo es necesario la acción en conjunto con CF como el ácido gálico, para lograr la inhibición con esta sinergia (Arjeh *et al.*, 2020; Elhadeb *et al.*, 2021; Grace *et al.*, 2016). Con base en los resultados, el extracto purificado logró inhibir a *S. aureus*, mientras que con el extracto oleoso se observó un halo con ligero crecimiento de colonias, lo cual indica que esta fracción oleosa tiene potencial para ralentizar el crecimiento microbiano hasta cierto punto, ya que requiere actuar en conjunto a otros compuestos que fueron retirados en la cromatografía. No obstante, estas variaciones en el resultado también se pueden deber al uso de papel Whatman, el cual contiene celulosa y puede retener CF por sus grupos hidroxilos evitando su correcta difusión en el agar, además de que se puede presentar el caso de no utilizar el inóculo adecuado en el estudio, ya que la concentración ideal para este tipo de ensayos es 1×10^5 UFC/mL. dado que en un inóculo bajo de 1×10^2 UFC/mL o alto de 1×10^8 UFC/mL puede arrojar resultados falsos positivos o falsos negativos dependiendo la concentración utilizada (Sánchez-García *et al.*, 2016).

Hasta cierto punto, aunque los extractos vegetales en general poseen actividad antibacteriana, no han sido utilizados por las altas concentraciones necesarias para emular el efecto de los antibióticos (Velasco *et al.*, 2020).

7. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el ruezno de pistache posee potencial para ser empleado en FES gracias a sus parámetros fisicoquímicos, puesto que puede presentar hasta un 82.29% de humedad y una absorción de agua de 5.73 g gel/gms, lo que se traduce en agua disponible para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos.

A. niger GH1 pudo crecer e invadir el ruezno de pistache con una tasa específica de crecimiento de 0.095 h⁻¹, presentando la mayor liberación de CF y CA a las 24 h de fermentación con las condiciones de proceso de 60% de humedad, una concentración de inóculo de 1x10⁷ esp/mL y 1 VKgm de aireación.

El proceso de FES logró un incremento del 129% en el contenido fenólico total respecto al ruezno de pistache sin fermentar, mientras que para la CA incrementó un 71% frente al radical DPPH, 124% en el ensayo ABTS y 1,039% en el ensayo FRAP, observando que los CF y la CA presentan una relación lineal positiva, donde al aumentar el contenido de CF aumenta también la CA.

El perfil de CF en el extracto purificado de ruezno de pistache mostró la presencia de ácido gálico 4-O-glucósido y geranina, importantes compuestos bioactivos a los que se les atribuye actividad antioxidante y antibacteriana.

El extracto purificado de ruezno de pistache a 1, 500 µg/mL inhibió el crecimiento de *S. aureus* en la fracción acuosa y un ralentizamiento del crecimiento en la fracción oleosa. Sin embargo, a una concentración de hasta 3, 000 µg/mL no causó ningún efecto contra *Salmonella* y *E. coli*.

Los resultados obtenidos demuestran el potencial antioxidante y antibacteriano que puede presentar el ruezno de pistache sometido a FES, generando una estrategia de aprovechamiento para darle un valor agregado a este residuo mediante la recuperación de moléculas con potencial aplicación en la industria alimentaria.

8. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el análisis exploratorio, demostrando el efecto de la humedad, concentración de inóculo y aireación, se podría diseñar una estrategia para optimizar el proceso de FES de ruezno de pistache con *A. niger* GH1.

Asimismo, resulta interesante profundizar en los aspectos bioquímicos del proceso de FES, determinando el metaboloma de los CF y actividades enzimáticas presentes, de tal forma que se puedan establecer correlaciones entre ambos.

Respecto al potencial antibacteriano de los extractos de ruezno de pistache, se recomienda el uso de técnicas cuantitativas, e incluso probar su efecto antifúngico ante cepas fitopatógenas de interés agrícola.

Debido a la evidencia de que los CF presentes en el RP exponen actividad antioxidante y antibacteriana, se puede desarrollar un producto a partir del extracto de RP fermentado mediante FES y detectar potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética o alimentaria.

9. REFERENCIAS

- Abbasi, S., Vahabzadeh, F. y Mehranian, M. 2007. Profiles of Phenolics and Antioxidant Activity of Pistachio Hulls During Solid-State Fermentation by *Phanerochaete chrysosporium* - Involvement of Lignin Peroxidase and Manganese Peroxidase. *Scientia Iranica*, Vol. 14, No. 4, pp 373 – 378.
- Álvarez, C. y Lock, O. 1992. Taninos. *Revista de Química*. Vol. VI. No. 1. p.p 47-63.
- Arjeh, E., Hamid-Reza, A., Barzegar, M. & Carbonell-Barrachina, A. 2020. Bio-active compounds and functional properties of pistachio hull: A review. *Trends in Food Science & Technology*. No. 97. p.p 55-64, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.031>
- Ascacio-Valdés, J., Aguilera-Carbó, A., Martínez-Hernández, J., Rodríguez-Herrera, R., y Aguilar, C. 2010. *Euphorbia antisiphilitica* residues as a new source of ellagic acid. *Chemical Papers/Chemické Zvesti*, 64(4), 528–532. DOI: <https://doi.org/10.2478/s11696-010-0034-6>
- Aspergillus* (P.Micheli 1729) in GBIF Secretariat 2023. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2024-05-20.
- Bello, A. (2014). Modelos de crecimiento en biología, su significado biológico y selección del modelo por ajuste. [Tesis Maestría en Ciencias, Matemáticas Aplicadas e Industriales]. División de Ciencias Básicas e Ingenierías. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.
- Brück, W.M., Díaz-Escobar, V.D.; Droz-dit-Busset, Escobar, V.D., Droz-dit-Busset, L., Baudin, M., Nicolet, N. y Andlauer, W. 2022. Fermentative Liberation of Ellagic Acid from Walnut Press Cake Ellagitannins. *Foods* 2022, 11, 3102. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11193102>
- Buenrostro-Figueroa, J.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 Processing*, 92(4), 376-382. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.08.010>
- Buenrostro-Figueroa, J.J., Velázquez, M., Flores-Ortega, O., Ascacio-Valdés, J.A., Huerta-Ochoa, S., Aguilar, C.N. y Prado-Barragán, L.A. 2017. Solid state fermentation of fig (*Ficus carica* L.) by-products using fungi to obtain phenolic compounds with antioxidant activity and qualitative evaluation of phenolics obtained. *Process Biochemistry*. Vol. 62. pp. 16 – 23. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.016>
- Buenrostro-Figueroa, J.J., Nevárez-Moorillón, G.V., Chávez-González, M.L., Sepúlveda, L., Ascacio-Valdés, J.A., Aguilar, C.N., Pedroza-Islas, R., Huerta-Ochoa, S. y Prado-Barragán, L.A. 2023. Improved Extraction of High Value-Added Polyphenols from Pomegranate Peel by Solid-State Fermentation. *Fermentation* 2023, 9, 530. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation9060530>
- Cabo, L., Achón, M. y González, M.P. 2015. Influencia de los ácidos grasos poliinsaturados en la prevención y promoción del cáncer. *Nutrición hospitalaria*. 2015; 32(1): 41-49. DOI:

<https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.8721>

- Cano y Postigo, L.O., Jacobo-Velazquez, D.A., Guajardo-Flores, D., Garcia Amezquita, L.E. y García-Cayuela, T. 2021. Solid-state fermentation for enhancing the nutraceutical content of agrifood by-products: Recent advances and its industrial feasibility. *Food Bioscience*. 41 (2021) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100926>
- Cañedo, V. y Ames. T. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú, 62 p.
- Cardullo, N., Leanza, M., Muccilli, V. y Tringali, C. 2021. Valorization of Agri-Food Waste from Pistachio Hard Shells: Extraction of Polyphenols as Natural Antioxidants. *Resources MDPI* 2021, 10, 45. DOI: <https://doi.org/10.3390/resources10050045>
- Casciadori, F.P. y Thoméo, J.C. 2018. Heat transfer in packed-beds of agricultural waste with low rates of air flow applicable to solid-state fermentation. *Chemical Engineering Science*, 188, 97–111. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.05.024>
- Cerda-Cejudo, N. D., Buenrostro-Figueroa, J. J., Sepúlveda, L., Torres-Leon, C., Chávez-González, M. L., Ascacio-Valdés, J. A., & Aguilar, C. N. 2022. Recovery of ellagic acid from mexican rambutan peel by solid-state fermentation-assisted extraction. *Food and Bioproducts Processing*, 134, 86-94.
- Cerda-Cejudo, N.D., Buenrostro-Figueroa, J.J., Sepúlveda-Torre, L.; Torres-León, C., Chávez-González, M.L., Ascacio-Valdés, J.A.; Aguilar, C.N. 2023. Solid-State Fermentation for the Recovery of Phenolic Compounds from Agro-Wastes. *Resources*, 12(3), 36, 86-94. DOI: <https://doi.org/10.3390/resources12030036>
- Chambi-Rodriguez, A.D. y Torres-Jiménez, A.M. 2021. Modelos cinéticos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Saccharomyces boulardii*. *Revista De Investigaciones Altoandinas*, 23(1), 47–54. DOI: <https://doi.org/10.18271/ria.2021.213>
- Cheng, H.S., Ton, S.H. y Kadir, K.A. 2016. Ellagitannin geraniin: a review of the natural sources, biosynthesis, pharmacokinetics and biological effects. *Phytochemistry Reviews*. Vol. 16,159–193. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9464-2>
- Costa, J.A.V., Treichel, H., Kumar, V., y Pandey, A. 2018. Advances in Solid-State Fermentation. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 1–17. DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63990-5.00001-3>
- Cuervo-Parra, J.A., Aparicio-Burgos, J.E., Pérez-España, V.H., Morales-Ovando, M.A., Peralta-Gil, M. y Romero-Cortes, T. 2023. Bioquímica de pared celular de Gram positivas y Gram negativas. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*. Vol. 0 No. 0, 1–8. DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v12i23.11450>
- Cueva, Y.M. 2017. Producción de α -amilasas mediante fermentación submersa de *Aspergillus niger* para su empleo en procesos de panificación. [Tesis Ingeniería en Biotecnología]. Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Universidad de las Américas. 175 p.
- De León-Delgado, M.M., Legarreta-González M.A., Olivas-García J.M., Guerrero-Morales S. & Baray-Guerrero, M.R. 2020. Análisis financiero y económico del cultivo del pistache en el Municipio de López, Chihuahua. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*. Vol 8 (2), 14-23. DOI: <https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v8i2.175>

- De León-Medina, J.C., Sepúlveda, L., Morlett-Chávez, J., Meléndez-Rentería, P., Zugasti-Cruz, A., Ascacio-Valdés J.A. y Aguilar C.N. 2020. Solid-State Fermentation with *Aspergillus niger* GH1 to Enhance Polyphenolic Content and Antioxidative Activity of Castilla Rose (*Purshia plicata*). *Plants*, 9(11), 1518, 1-15. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9111518>
- De Santiago, E., Ordóñez-Díaz, J.L., Pereira-Caro, G., Arquero, A., Lovera, M., Moreno-Rojas, J.M., Ortiz-Somovilla, V. 2022. Compuestos biosaludables del pistacho. Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera. Córdoba. 1-23
- Domingo, D. y López-Brea, M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. Vol. 16. No. 4, 385-393.
- Elhadeif, K., Akermi, S., Ben Hlima, H., Ennouri, K., Fourati, M., Ben Braïek, O., Mellouli, L. y Smaoui, S. 2021. Tunisian Pistachio Hull Extracts: Phytochemical Content, Antioxidant Activity, and Foodborne Pathogen Inhibition. *Hindawi Journal of Food Quality*. Volume 2021, 1-18. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/9953545>
- Erşan, S., Güçlü-Üstündağ, O., Carle, R. y Schweiggert, R.M. 2018. Subcritical water extraction of phenolic and antioxidant constituents from pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls. *Food Chemistry*, Vol. 253, 46-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.116>
- Erşan, S., Üstündağ, Z.G., Carle, R., y Schweiggert, R.M. 2016. Identification of Phenolic Compounds in Red and Green Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(26), 5334–5344. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b01745>
- Fernández, D., Apunte, D. y Hechavarría, R. 2022. Cinética de crecimiento del *Aspergillus niger* en *Solanum tuberosum*. *Revista Alimentos, Ciencia e Ingeniería*. Vol. 29 No. 2. 1-10
- Figueroa-Montero, A.A. 2011. Modelamiento de la transferencia de calor y masa (agua) en un biorreactor de charolas para fermentación en medio sólido. [Tesis Doctorado en Biotecnología]. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 185 p.
- García, A.M. 2016. Marco conceptual sobre la influencia de la temperatura y la humedad relativa en la fermentación sólida del grano de café arábica sobre el contenido del ácido 5-o-cafeoilquínico. [Tesis de Maestría en Ingeniería]. Escuela de Ingenierías. Universidad Pontificia Bolivariana.
- Garre-Pérez, A., Egea-Larrosa, J.A. y Fernández-Escámez, P.S. 2016. Modelos matemáticos para la descripción del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos. *In Anuario de Jóvenes Investigadores*. Vol. 9, 160-163.
- Gómez, M.P., Arboleda, J.M. y Mosquera, O.M. 2021. Género *Aspergillus*: fuente potencial de péptidos bioactivos. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 17(1), 73–89. DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.5610>
- Gonçalves, C., Medeiros, V.D., de Freitas, A.C., Ramalho, M., Augusti, R., Ferreira, J.O., Almeida, L. y Argenta, C. 2022. Characterization and identification of bioactive compounds in agro-food waste flours. *Quim. Nova*, 45(4), 403-409. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170853>

- Grace, M.H., Esposito, D., Timmers, M.A., Xiong, J., Yousef, G., Komarnytsky, C. y Lila, M.A. 2016. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory properties of pistachio hull extracts. *Food Chemistry* 210, 85–95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.088>
- Gu, X., Sun, Y., Tu, K., Dong, Q., y Pan, L. 2016. Predicting the growth situation of *Pseudomonas aeruginosa* on agar plates and meat stuffs using gas sensors. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep38721>
- Hamed, M., Bougatef, H., Karoud, W., Krichen, F., Haddar, A., Bougatef, A., & Sila, A. 2020. Polysaccharides extracted from pistachio external hull: Characterization, antioxidant activity and potential application on meat as preservative. *Industrial Crops and Products*, 148, 112315. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112315>
- Hasheminya, S.M., y Dehghannya, J. 2020. Composition, phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of *Pistacia atlantica* subsp. *kurdica* hulls' essential oil. *Food Bioscience*, 34, 100510. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100510>
- Hemeg, H.A., Moussa, I.M., Ibrahim, S., Dawoud, T.M., Alhaji, J.H., Mubarak, A.S., Kabli, S.A., Alsubki, R.A. Tawfik, A.M. y Marouf, S.A. 2020. Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 27, 3221 – 3227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.015>
- Herrera, G.M. 2021. Fermentación sólida en la industria alimentaria. [Tesis de Ingeniería en Alimentos]. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología. Universidad Técnica de Ambato. 55 p.
- Ibarra-Cantún, D., Ramos-Cassellis, M.E., Sánchez-Arzubide, M.G., Castelán-Vega, R.C. y Marín-Castro, M.A. 2022. Compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de la fermentación en estado sólido de bagazo de manzana (*Malus domestica* Borkh., var. panochera). *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 23(2), e2103. DOI: https://doi.org/10.21930/rcta.vol23_num2_art:2103
- Jachimowicz, P., Cydzik, A. y Szklarz, P. 2020. Effect of Aeration Mode on Microbial Structure and Efficiency of Treatment of TSS-Rich Wastewater from Meat Processing. *Applied Sciences*. 10(21), 7414; DOI: <https://doi.org/10.3390/app10217414>
- Juárez, M.I. 2015. Fisiología de crecimiento de *Aspergillus niger* en fermentación en medio sólido con diferentes soportes. [Tesis de Maestría en Biotecnología]. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 87 p.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., y HZE, J. 2017. Solid state fermentation effects on pistachio hulls antioxidant activities. *Asia-Pacific Journal of Science and Technology*, 15(5), 360–366. DOI: <https://so01.tci-thaijo.org/index.php/APST/article/view/83178>
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A.K., y Singhania, R.R. 2020. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: Challenges and solutions. *Bioresource Technology*, 323, 124566, 1-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124566>
- Kumar, P., Duhan, S. y Singh, J. 2018. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*. 5(1), 1-15. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0187-z>

- Król-Grzymała, A. y Amarowicz, R. 2020. Phenolic Compounds of Soybean Seeds from Two European Countries and Their Antioxidant Properties. *Molecules* 25(9), 2075. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25092075>
- Leite, P., Belo, I. y Salgado, J.M. 2021. Co-management of agro-industrial wastes by solid-state fermentation for the production of bioactive compounds. *Industrial Crops & Products*. 172, 113990. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113990>
- Lizardi-Jiménez, M. A., y Hernández-Martínez, R. 2017. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. *3 Biotech*, 7(1). DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0692-y>
- López-Cárdenas, F., Ochoa-Reyes, E., Baeza-Jiménez, R., Tafolla-Arellano, J.C., Ascacio-Valdés, J.A., Buenrostro-Figueroa, J.J. 2023. Solid-State Fermentation as a Sustainable Tool for Extracting Phenolic Compounds from Cascalote Pods. *Fermentation* 9, 823. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation9090823>
- Mandalari, G., Barreca, D., Gervasi, T., Roussel, M.A., Klein, B., Feeney, M.J. y Carughi, A. 2021. Pistachio Nuts (*Pistacia vera* L.): Production, Nutrients, Bioactives and Novel Health Effects. *Plants*. 11(1), 18. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11010018>
- Martínez-Ávila, G.C., Ascacio-Valdés, J.A., Sepúlveda-Torre, L., Rodríguez-Herrera, R., Aguilera-Carbó, A., y Aguilar, C.N. 2013. Extracción Asistida por Fermentación Fúngica de Antioxidantes Fenólicos. *Acta Química Mexicana*, Vol. 5. Núm. 16-24. Disponible en: <http://www.actaquimicamexicana.uadec.mx/?p=571>
- Martínez-Ruiz, N.R., García, J.R. & Corral-Díaz, B. 2019. Efecto del secado controlado sobre la calidad nutrimental del pistache (*Pistacia vera* L.) y subproductos producidos en el Valle de Juárez, Chihuahua, México (ICB Reporte Técnico). Productos de Creación Artística, Tecnológica, Humanidades e Investigación Científica, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. 22 p.
- Martín, D.A. 2018. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 9(1), 81–104. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Mateos, R., Salvador, M.D., Fregapane, G. y Goya, L. 2022. Why Should Pistachio Be a Regular Food in Our Diet? *Nutrients*. 14(15), 3207. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14153207>
- Mattedi, A., Sabbi, E., Farda, B., Djebaili, R., Mitra, D., Ercole, C., Cacchio, P., Del Gallo, M., y Pellegrini, M. 2023. Solid-State Fermentation: Applications and Future Perspectives for Biostimulant and Biopesticides Production. *Microorganisms*, 11(6), 1408. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061408>
- Meléndez, N.P., Nevárez-Moorillón, V., Rodríguez-Herrera, R., Espinoza, J.C. y Aguilar, C.N. 2014. A microassay for quantification of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. *African Journal of Biochemistry Research*. 8(1), 14–18. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJBR2013.0669>
- Méndez-González, F., Figueroa-Montero, A., Saucedo-Castañeda, G., Loera, O. y Favela-Torres, E. 2021. Addition of spherical-style packing improves the production of conidia by *Metarhizium robertsii* in packed column bioreactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 97(6), 1517–1525. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.6993>

- Méndez, J.A. 2013. Producción de ácido glucónico aplicando cinética de crecimiento microbiano a partir de *Aspergillus niger* y como medio de cultivo, dulce de atado. [Tesis Licenciatura en Química y Farmacia]. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 184 p.
- Moreno-Rojas, J.M., Velasco-Ruiz, I., Lovera, M., Ordoñez-Díaz, J.L., Ortiz-Somovilla, V., De Santiago, E., Arquero, O. y Pereira-Caro, G. 2022. Evaluation of Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Eleven Pistachio Cultivars (*Pistacia vera* L.) Cultivated in Andalusia. *Antioxidants*. 11(4), 609. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11040609>
- Neval-Özbek, H., Yanık, D.K., Fadiloğlu, S. y Göğüş, F. 2019. Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from pistachio (*Pistacia vera* L.) hull. *Separation Science and Technology*. 55(2), 289–299. DOI: <https://doi.org/10.1080/01496395.2019.1577444>
- Neval-Özbek, H., Halahlıh, F., Göğüş, F., Yanık, D.K. y Azaizeh, H. 2018. Pistachio (*Pistacia vera* L.) Hull as a Potential Source of Phenolic Compounds: Evaluation of Ethanol–Water Binary Solvent Extraction on Antioxidant Activity and Phenolic Content of Pistachio Hull Extracts. *Waste and Biomass Valorization*. 11(5), 2101–2110. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0512-6>
- Noorolahi, Z., Sahari, M.A., Barzegar, M. y Gavlighi, H.A. 2020. Tannin fraction of pistachio green hull extract with pancreatic lipase inhibitory and antioxidant activity. *Journal of Food Biochemistry*. 44(6). DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.13208>
- Oiza, N., Moral-Vico, J., Sánchez, A., Oviedo, E.R. y Gea, T. 2022. Solid-State Fermentation from Organic Wastes: A New Generation of Bioproducts. *Processes*, 10(12), 2675. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr10122675>
- Olvera, M.R. 2022. Caracterización química y nutracéutica del pistache (*Pistacia vera* l.) tostado, así como la evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro*, permeabilidad *ex vivo* y análisis quimiinformático *in silico*. [Tesis Ingeniería Química en Alimentos]. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. 89 p.
- Orzua, M.C., Mussatto, S.I., Contreras-Esquivel, J.C., Rodríguez, R., de la Garza, H., Teixeira, J.A. y Aguilera, C.N. 2009. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30(1), 24–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.02.001>
- Pakdaman, N., Dargahi,R., Nadi, M., Javanshah, A., Shakerardekani, A. y Saberi, N. 2021. Optimizing the Extraction of Phenolic Compounds from Pistachio Hulls. *Journal of Nuts*, 12(4), 361-370. DOI: <https://doi.org/10.22034/jon.2021.1941474.1132>
- Paz-Arteaga, S.L., Ascacio-Valdés, J.A., Aguilar, C.N. Cadena-Chamorro, E., Serna-Cock, L., Aguilar-González, M.A., Ramírez-Guzmán, N. y Torres-León, C. 2023. Bioprocessing of pineapple waste for sustainable production of bioactive compounds using solid-state fermentation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 85, 103313. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103313>
- Peñarrieta, J.M., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J.L. y Bravo, J.A. 2014. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81.
- Pistacia vera* L. in GBIF Secretariat 2021. *GBIF Backbone Taxonomy*. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2022-11-08.

- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. 2009. Fungi and food spoilage. 3ra edición. Springer. CSIRO Food and Nutritional Sciences. North Ryde, Australia. 525 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Quiroz, C.D. 2017. Comparación Del Ajuste Del Modelo Logístico y Gompertz de Crecimiento A Partir de Datos Históricos de Población Norteamericana. *Matemática IV Métodos Numéricos y Modelado Matemático* 00, 1–12
- Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A.M., Sahari, M.A. y Esfahani, Z.H. 2010. Antioxidant, antimicrobial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract. *Food and Chemical Toxicology* 48(1), 107–112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.023>
- Ramírez-Esparza, U., Ochoa-Reyes, E., Baeza-Jiménez, R. y Buenrostro-Figueroa, J.J. 2024. Efecto de la fermentación en medio sólido sobre el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante del maíz. *CienciaUAT* 18(2), 136-144. DOI: <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v18i2.1801>
- Ramos, L. 2012. Obtención de fitomoléculas bioactivas mediante procesos de fermentación fúngica utilizando como fuente de carbono residuos de nogal pecanero (*Carya illinoensis*). [Tesis Ingeniero en Ciencia y Tecnología de los Alimentos]. División de Ciencia Animal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 93 p.
- Reyes-Ocampo, I., González-Brambila, M. y López-Isunza, F. 2013. Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12(1), 41-56.
- Ridder, E.R., Nokes, S.E., y Knutson, B.L. 1999. Optimization of Solid-State Fermentation Parameters for the Production of Xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on Wheat Bran in a Forced Aeration System. *Biosystems and Agricultural Engineering Faculty Publications* 42(6), 1785-1790. DOI: https://uknowledge.uky.edu/bae_facpub/108
- Rodríguez-Fernández, D., Rodríguez-León, J., De Carvalho, J., Karp, S., Sturm, W., Parada, J., y Soccol, C. 2012. Influence of airflow intensity on phytase production by solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 118, 603–606. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.032>
- Rojo-Gutiérrez, E., Carrasco-Molinar, O., Tirado-Gallegos, J.M., Levario-Gómez, A., Chávez-González, M.L., Baeza-Jiménez, R. y Buenrostro-Figueroa, J.J. 2021. Evaluation of green extraction processes, lipid composition and antioxidant activity of pomegranate seed oil. *Journal of Food Measurement and Characterization* 15(2), 2098–2107. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00804-7>
- Salazar, C.L., & Rua, A.L. 2014. Características morfológicas microscópicas de especies de *Aspergillus* asociadas a infecciones en humanos. *Hechos Microbiológicos*, 3(2), 93–96. DOI: <https://doi.org/10.17533/udea.hm.18741>
- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L., y García-Palencia, P. 2016. Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., y Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 77-100.
- Serra-Bisbal, J.J, Melero-Lloret, J., Martínez-Lozano, G. y Fagoaga-García, C. (2020). Especies vegetales como antioxidantes de alimentos. *Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar*

de *Métodos, Modelización y Simulación*, 12, 71–90. DOI: https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.577

- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2019. ¿te gusta el pistache?. Recuperado de <https://www.gob.mx/senasica/articulos/y-a-ti-te-gusta-el-pistache?idiom=es>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Estadísticas de cierre de producción agrícola. Recuperado de <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Schulze, N., Feuereisen, M.M. y Schieber, A. 2015. Phenolic compounds in edible species of the Anacardiaceae family – a review. *Royal Society of Chemistry. RSC Advances* 5(89), 73301–73314. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5ra11746a>
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R. y Dhaka, N. (2013). Aplicaciones potenciales de los antioxidantes: una revisión. *Journal of Pharmacy Research*, 7 (9), 828–835. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>
- Smeriglio, A., Denaro, M., Barreca, D., Calderaro, A., Bisignano, C., Ginestra, G., Bellocco, E. Y Trombetta, D. 2017. In Vitro Evaluation of the Antioxidant, Cytoprotective, and Antimicrobial Properties of Essential Oil from *Pistacia vera* L. Variety Bronte Hull. *International Journal of Molecular Sciences* 18(6), 1212; DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18061212>
- Tang, P. L., y Hassan, O. 2020. Bioconversion of ferulic acid attained from pineapple peels and pineapple crown leaves into vanillic acid and vanillin by *Aspergillus niger* I-1472. *BMC Chemistry*, 14(1). DOI: <https://doi.org/10.1186/s13065-020-06663-y>
- Toghiani, J., Fallah, N., Nasernejad, B., Mahboubi, A., Taherzadeh, M.J. y Afsham, N. 2022. Sustainable Pistachio Dehulling Waste Management and Its Valorization Approaches: A Review. *Biology and pollution* 9, 60–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40726-022-00240-9>
- Thegarathah, P., Jewaratnam, J., y Simarani, K. 2022. Turbidity reduction in palm oil mill effluent (POME) by submerged fermentation with immobilized *Aspergillus niger* spores using coconut husk. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science*, 1074(1), 1-5. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1074/1/012027>
- Thomas, L., Larroche, C., y Pandey, A. 2013. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81, 146–161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.013>
- Torres-León, C., Ramírez-Guzmán, N., Ascacio-Valdés, J., Serna-Cock, L., dos Santos Correia, M. T., Contreras-Esquivel, J. C., y Aguilar, C. N. 2019. Solid-state fermentation with *Aspergillus niger* to enhance the phenolic contents and antioxidative activity of Mexican mango seed: A promising source of natural antioxidants. *Lebensmittel-Wissenschaft + Technologie – Food Science and Technology*. 112(108236), 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.06.003>
- Vargas, Y.A. y Pérez, L.I. 2018. Aprovechamiento de residuos agroindustriales para el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 14 (1), 59-72. DOI: <http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.3108>
- Vázquez-Flores, A.A., Alvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J.A., Wall-Medrano, A. y De La Rosa,

- L.A. 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua* 6(2), 84-93.
- Velasco-García, W.J., Pabón-Baquero, L.C. y Hernández-Rodríguez, P. 2020. Potencial antimicrobiano de extractos de plantas medicinales y sus mezclas frente a bacterias asociadas con conjuntivitis. *NOVA* 19(36), 95–108. DOI: <https://doi.org/10.22490/24629448.5294>
- Venereo, J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31(2), 126-33.
- Villegas, D., Valbuena, N. y Milla, M. 2019. Evaluación de modelos aplicados a la producción de materia seca de *Brachiaria brizantha* en el periodo lluvioso. *Revista de Ciencias Agrícolas* 36(1), 33-45. DOI: <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.193601.96>
- United States Department of Agriculture (USDA). 2022. Tree Nuts: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service. United States of America. DOI: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/TreeNuts.pdf>
- Waites, M., Morgan, N., Rockey, J. y Higton, G. 2001. Industrial Microbiology: An introduction. *Blackwell Science Ltd.* 302 p. ISBN 0-632-05307-0. DOI: <https://4lfonsina.files.wordpress.com/2012/11/industrial-microbiology-an-introduction-0632053070-wiley.pdf>
- Wong-Paz, J.E., Muñoz-Márquez, D.B., Aguilar-Zárate, P., Rodríguez-Herrera, R. y Aguilar, C.N. 2014. Microplate Quantification of Total Phenolic Content from Plant Extracts Obtained by Conventional and Ultrasound Methods. *Phytochemical Analysis* 25(5), 439–444. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.2512>
- Zhou, Y., Han, L.R., He, H.W., Sang, B., Yu, D.L., Feng, J.T., y Zhang, X. 2018. Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. *Molecules*, 23(1), 125. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23010125>