

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE HIDROLIZADOS
PROVENIENTES DE RESIDUOS VINÍCOLAS DE BAJA
CALIFORNIA**

**TESIS
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:**

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO

**PRESENTA:
JUAN PEDRO PÉREZ PÉREZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. OLIVIA TZINTZUN CAMACHO**

EJIDO NUEVO LEÓN, MEXICALI, B.C. OCTUBRE 2019

ESTA TESIS FUE ACEPTADA POR EL COMITÉ REVISOR, MISMO QUE LA DIRIGIO Y LA APROBÓ COMO REQUISITO PARCIAL PARA LA OBTENCIÓN DEL:

TÍTULO DE:

INGENIERO BIOTECNÓLOGO AGROPECUARIO.

COMITÉ REVISOR

DRA. OLIVIA TZINTZUN CAMACHO
PRESIDENTE

DR. DANIEL GONZALEZ MENDOZA
SECRETARIO

DR. DAGOBERTO DURAN HERNANDEZ
SINODAL

M.C. CARLOS CECEÑA DURAN
SINODAL

EJIDO NUEVO LEÓN, MEXICALI, B.C. OCTUBRE 2019

I. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me apoyaron en mi camino, a esas personas que siguen al lado de mi dándome ánimos para así poder seguir adelante en mi trayectoria.

Quiero agradecer a esas personas las cuales se fueron convirtiendo en mi familia con el paso de los años, agradecer por las experiencias que me brindaron por que *la familia no siempre es sangre, la familia es lo que tú haces, la familia nunca se da por vencida nunca se da la espalda a los que amas.*

Quiero agradecer a mis abuelos y padres los cuales me brindaron sus conocimientos y enseñanzas para así poder hacer de mí una persona responsable y dedicada.

II. DEDICATORIA

A mis maestros:

Dedico esta tesis a mis maestros los cuales me brindaron sus conocimientos para así poder llevar a cabo este proyecto, en el obtuve varias experiencias las cuales me llevaron a mi vida laboral, gracias a la Dra. Olivia Tzintzun Camacho por acompañarme en el camino para lograr la elaboración de esta tesis la cual sin su ayuda y conocimientos no hubiera podido seguir avanzando.

A mis padres:

Quiero dedicar esta tesis a mis padres los cuales siempre estuvieron apoyándome hasta el último momento y que a pesar de haber terminado mi educación profesional ellos me siguen apoyando con sus consejos, la dedicación que ellos mostraron conmigo es la que yo les dedique a mis estudios ellos me enseñaron a cumplir con todo lo que me propusiera en esta vida y hasta la fecha se los sigo cumpliendo.

A mis amigos:

Le dedico esta tesis a mis compañeros gracias a que con ellos compartí experiencias de todo tipo a lo largo de mi educación profesional, gracias que nos apoyábamos mutuamente durante clases para fortalecer nuestra educación.

A mis familiares:

Quiero dedicar esta tesis a mis familiares los cuales me apoyaron incondicionalmente para poder lograr esa meta a mis tíos, tías, primos y primas las cuales siempre me ayudaban en los momentos difíciles al momento de pagar mi colegiatura o en algún viaje para fortalecer mi experiencia educativa.

ÍNDICE

I. AGRADECIMIENTOS	3
II. DEDICATORIA	4
III. LISTA DE FIGURAS	7
IV. LISTA DE TABLAS	7
V. RESUMEN	8
VI. ABSTRACT	10
I.INTRODUCCIÓN	12
II. REVISIÓN DE LITERATURA	14
2.1. Área vinícola de Baja California	14
2.2. Proceso de elaboración del vino	16
2.3. Residuos agropecuarios y agroindustriales	18
2.4. Pretratamientos de residuos agropecuarios y agroindustriales	19
2.5. Aprovechamiento de residuos vinícolas	20
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo General	25
5.2. Objetivos Particulares	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Muestreo de residuos vinícolas	26
6.2. Obtención de polvos de residuos vinícolas	26
6.3. Obtención de hidrolizados de residuos vinícolas	26
6.3.1 Primera etapa:	27
6.3.2 Segunda etapa:	27
6.3.3 Tercera etapa:	27
6.3.4 Cuarta etapa:	27
6.4. Determinación de azúcares reductores	28
6.5. Determinación de azúcares totales	28
6.6. Determinación de fenoles totales	29
6.7. Ensayos de germinación de semillas empleando hidrolizados de residuos vinícolas	29

6.8. Evaluación de la actividad antifúngica de los hidrolizados de residuos vinícolas ...	30
6.9. Análisis estadístico.....	31
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
7.1. Caracterización másica de los residuos vinícolas	32
7.2. Evaluación del proceso de hidrólisis de los residuos vinícolas	33
7.3. Efecto de los hidrolizados sobre la germinación de semilla	36
7.3.1. Índice de germinación	36
7.4. Efecto de los hidrolizados en el control de hongos fitopatógenos	40
VII. CONCLUSIONES	43
IX. PERSPECTIVAS	44
X. BIBLIOGRAFÍA.....	45

III. LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Casas vitivinícolas en la ruta del vino ensenada, baja california (garritz, 2011). 15	15
FIGURA 2. Residuos vinícolas generados durante el proceso de obtención del vino. 18	18
FIGURA 3. Diferentes pretratamientos para el procesamiento de los residuos agroindustriales. 19	19
FIGURA 4. Composición másica de los orujos de uva para vino tinto, rosado y blanco obtenidos de industrias vinícolas del valle de guadalupe en ensenada, baja california. 32	32
FIGURA 5. Concentración de azúcares reductores y totales en los hidrolizados de orujo de uva para vino tinto, rosado y blanco. los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (prueba tukey-kramer, $\alpha \leq 0.5$). 34	34
FIGURA 6. Concentración de fenoles totales (expresados como equivalentes de ácido gálico) en los hidrolizados de orujo de uva para vino tinto, rosado y blanco. los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (prueba tukey-kramer, $\alpha \leq 0.5$). 35	35
FIGURA 7. Índice de germinación de seis especies de semillas bajo diferentes tratamientos: a) experimentos control (semillas tratadas con agua destilada), b) experimentos con hidrolizado de orujo de vino rosado..... 37	37
FIGURA 8. Efecto del hidrolizado de orujo de vino rosado sobre el crecimiento de las raíces de acelga, albahaca, cebollín, lechuga, rábano y chile serrano. los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (prueba tukey-kramer, $\alpha \leq 0.5$). 38	38
FIGURA 9. Efecto del hidrolizado de orujo de vino rosado sobre el crecimiento de la parte aérea de acelga, albahaca, cebollín, lechuga, rábano y chile serrano. los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (prueba tukey-kramer, $\alpha \leq 0.5$). 39	39

IV. LISTA DE TABLAS

TABLA 1 etapas de la elaboración del vino (lópez y sotelo, 2014)..... 17	17
---	----

V. RESUMEN

El estado de Baja California es uno de los principales productores de vino a nivel nacional. Derivado de la actividad vinícola se genera una gran cantidad de residuos (semillas, hollejos y palillos de la uva) que no son dispuestos y aprovechados adecuadamente. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la funcionalidad de los hidrolizados provenientes de residuos vinícolas de Baja California sobre el desarrollo de cultivos agrícolas y la inhibición de hongos fitopatógenos. De esta forma se recolectaron muestras de orujo de vino tinto, blanco y rosado generados por dos industrias vinícolas en el Valle de Guadalupe. Los residuos se secaron y molieron hasta la obtención de un polvo. Posteriormente, se realizó un proceso de hidrólisis ácida de los polvos seguido de un tratamiento térmico a alta presión para la obtención de los hidrolizados. Se realizó la caracterización de los hidrolizados determinando la concentración de azúcares reductores, azúcares totales y fenoles totales. Asimismo, se realizaron pruebas de funcionalidad de los hidrolizados para evaluar: (i) la germinación de semillas de seis especies agrícolas diferentes: (acelga, albahaca, cebollín, lechuga, rábano y chile serrano); y (ii) la actividad antimicrobiana de los hidrolizados contra tres hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria* spp., y *Botrytis* spp). Como resultado se obtuvo que la concentración de azúcares reductores y totales fue mayor en los hidrolizados de orujo vino rosado (8.12 ± 0.61 g/L y 13.22 ± 0.80 g/L, respectivamente), seguido del orujo de vino blanco (4.67 ± 0.48 g/L y 13.78 ± 2.21 g/L, respectivamente) y tinto (0.72 ± 0.05 g/L y 2.90 ± 0.1 g/L). En cuanto a la concentración de fenoles totales se obtuvo una mayor concentración en el hidrolizado de vino tinto (0.32 ± 0.04 mg/mL), en comparación con el vino rosado (0.20 ± 0.01 mg/mL) y blanco (0.18 ± 0.01 mg/mL). Cabe destacar que el hidrolizado de vino rosado estimuló la germinación de semillas de lechuga y rábano en comparación con el tratamiento control. Además, se observó que el hidrolizado de orujo de vino rosado fue más efectivo para inhibir el crecimiento y esporulación de *F. oxysporum* y *Botrytis* spp. Mientras que para

Alternaria spp. se observó una mayor inhibición con el hidrolizado de orujo de vino tinto. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo son evidencia del aprovechamiento de los hidrolizados vinícolas en el área agrícola, principalmente, en la germinación de semillas y control de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: hidrolizados, orujos de uva, azúcares, fenoles, hongos fitopatógenos.

VI. ABSTRACT

The state of Baja California is one of the main wine producers nationwide. Derived from the wine activity, a large amount of waste is generated (seeds, skins and grape sticks) that are not discarded and used properly. Therefore, the aim of this study was to evaluate the functionality of hydrolysates from wine residues of Baja California on the development of agricultural crops and the growth inhibition of phytopathogenic fungi. Marc samples of red wine, white and pink were collected from two wine industries in the Guadalupe Valley. The residues were dried and ground until a powder was obtained. Subsequently, an acid hydrolysis process of the powders was carried out and followed by a high-pressure thermal treatment to obtain the hydrolysates. Characterization of hydrolysates was conducted analyzing the concentration of reducing sugars, total sugars and total phenols. In addition, functional assays of the hydrolysates were carried out to evaluate: (i) the germination of six different agricultural species (chard, basil, chives, lettuce, radish and serrano pepper); and (ii) the antimicrobial activity of hydrolysates against phytopathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria* spp., and *Botrytis* spp.). As result, the concentration of reducing and total sugars was high in the hydrolysates of pink wine marc (8.12 ± 0.61 g/L and 13.22 ± 0.80 g/L, respectively), followed by the white wine marc (4.67 ± 0.48 g/L y 13.78 ± 2.21 g/L, respectively) and red marc (0.72 ± 0.05 g/L and 2.90 ± 0.1 g/L). A high concentration of phenols was obtained in the hydrolysates of red wine (0.32 ± 0.04 mg/mL), compared with the pink wine (0.20 ± 0.01 mg/mL) and white (0.18 ± 0.01 mg/mL). It is important mention that the hydrolysates of pink wine stimulated the germination of lettuce and radish seeds compared with the control treatment. In addition, the hydrolysates of pink wine were more effective in inhibiting the growth and sporulation of *F. oxysporum* and *Botrytis* spp. In contrast, *Alternaria* spp. showed a greater inhibition with the hydrolysates of red wine marc.

Therefore, the results obtained in this study are evidence of the use of wine hydrolysates in the agricultural area, mainly, for the seed germination and control of phytopathogenic fungi.

Keywords: hydrolysates, grape marc, sugars, phenols, phytopathogenic fungi.

I.INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales productores de vino en Latinoamérica (Sánchez, 2006), y se encuentra dentro de los primeros treinta productores a nivel mundial según datos de la Organización Internacional del Vino (OIV, 2018). Cabe destacar que, a nivel nacional se producen anualmente 65 mil toneladas de uvas para vino siendo los principales productores los estados de Baja California, Zacatecas, Coahuila y Querétaro (SADER, 2018). Las principales variedades de uva sembradas son las tintas como *Cabernet Sauvignon*, *Carignan*, *Merlot* y *Tempranillo* y, blancas, como *Chenin Blanc*, *Chardonnay*, *Early Divine* y *Saint Emilion* (SADER, 2018). Es importante mencionar que a lo largo del proceso de elaboración del vino se genera una gran cantidad de residuos sólidos denominados orujos (semillas y hollejos), y raspones de la uva. En algunas ocasiones los residuos son empleados como composta, pero la mayoría de las veces son almacenados a cielo abierto siendo un foco potencial de contaminación para el medio ambiente. En la actualidad la valorización de los residuos vinícolas ha ganado interés debido a los compuestos bioactivos que contienen, principalmente, los compuestos fenólicos. En el caso de las semillas, se ha reportado que están compuestas por 40% de fibra, 16% de aceites esenciales, 11% de proteínas y 7% de compuestos fenólicos (Campos *et al.*, 2008). Mientras que la piel de la uva se caracteriza por ser una fuente rica de antocianinas (Pedreschi y Cisneros-Zevallos, 2006). Cabe destacar que los compuestos fenólicos son de interés en el área cosmética, farmacéutica y la industria de alimentos (Makris *et al.*, 2007; Peixoto *et al.*, 2018) debido a las propiedades de los fenoles como antioxidantes, antitumorales, antimicrobianas y como agentes antiinflamatorios (Xia *et al.*, 2010; Yu y Ahmedna, 2013). De esta forma se han generado diferentes investigaciones enfocadas al aprovechamiento de los residuos vinícolas. Por ejemplo, Agustin-Salazar *et al.*, (2014) identificaron compuestos fenólicos en extractos del orujo de *Vitis vinífera* L., y evaluaron su

capacidad antioxidante. Por otra parte, Oliveira *et al.*, (2015) identificaron antocianinas y pigmentos derivados de las antocianinas en orujo de uva roja. En estudios aplicados, Sánchez *et al.*, (2002) evaluaron la biodegradación de residuos vinícolas por *Pleurotus* para obtener alimentos de fácil digestión para el ganado. Por otro lado, Chaparro-Mercado *et al.*, (2014) evaluaron las propiedades nutracéuticas y funcionales de las semillas de la uva. Por lo tanto, es necesario establecer metodologías adecuadas para el pretratamiento de los residuos vinícolas y la extracción de sus compuestos bioactivos; así como incrementar la aplicación de los compuestos fenólicos provenientes de los residuos vinícolas, principalmente, en el área agrícola para el control de bacterias y hongos fitopatógenos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Área vinícola de Baja California

El estado de Baja California se encuentra ubicado en la zona fronteriza del país, colindando con los estados Sonora y Baja California Sur, al norte con Estados Unidos de América. Entre los principales atractivos turísticos se encuentran las zonas montañosas, bosques de coníferas, desierto y grandes extensiones de valles. Las principales actividades económicas del estado son la industria, el desarrollo de *software*, ganadería y agricultura, pero destaca la industria vitivinícola. Cabe destacar que el estado produce el 90% del vino nacional y debido a su calidad tiene una fuerte aceptación en el mercado internacional (Meraz-Ruiz y Wise-Lozano, 2018).

En el valle de Guadalupe en Ensenada, Baja California se concentra más de cuatro mil hectáreas para el cultivo de la uva (Meraz-Ruiz y Wise-Lozano, 2018), ofreciendo además una oferta turística sobre la ruta del vino (Figura 1) donde se encuentran diferentes casas vitivinícolas entre las más importantes L.A. CETTO y Bodegas Santo Tomás. Para finales de 1990 se favoreció el crecimiento de casas vitivinícolas pequeñas entre las que destacan: Monte Xanic, Cavas Valmar, Vinos Roganto, Mogor Badán, Casa Liceaga, Chateau Camou, Barón Balché, Viñedos Lafarga, Paralelo, Casa de Piedra, Villa Montefiori, Viñas Pijoan, Adobe Guadalupe, Pasionbiba, Vinos Shimul, Vinos Bibayoff, Vinícola Don Juan Vinos Sueños, Vinícola JC Bravo, entre otras (Quiñonez-Ramírez *et al.*, 2012).



Figura 1. Casas vitivinícolas en la ruta del vino Ensenada, Baja California (Garritz, 2011).

Algunas de estas casas se encuentran distribuidas en el Valle de Guadalupe, Valle de las Palmas, San Vicente, Santo Tomás, San Antonio de las Minas, Ejido Uruapan y Ojos Negros. Entre las principales variedades de uva que se cultivan para vinos tintos son: *Misión*, *Grenache*, *Cariñana*, *Tempranillo*, *Cabernet Sauvignon*, *Cabernet Franc*, *Merlot*, *Malbec*, *Petit Verdot*, *Nebbiolo*, *Barbera*, *Dolcetto*, *Zinfandel*, *Syrah*, *Mourvedre*, *Cinsault* y *Petit Syrah* (Velázquez-Córdoba, 2017). En cuanto a las uvas blancas, se producen las variedades *Palomino*, *Chenin Blanc*, *Sauvignon Blanc*, *Chardonnay*, *Viognier* y *Moscatel*. Baja California se caracteriza por tener climas extremos, sin embargo, en la región vitivinícola se alcanzan temperaturas promedio entre 12 y 24 °C. Las precipitaciones pluviales anuales son escasas alrededor de 62.2 mm para el año 2017 (CONACYT, 2017). Las bajas probabilidades de nevada en las zonas de los valles son escasas, así como la probabilidad de granizadas que podrían dañar los cultivos de vid y los frutos (Cavazos-Pérez, 2012). Debido a la cercanía de la costa, la humedad se encuentra alrededor del 60 %, la cual permite la transpiración foliar en la vid.

Los suelos característicos de la región vitivinícola de Ensenada son homogéneos, de muy buena profundidad, la mayoría de las regiones presentan un tipo de suelo con textura arenosas y areno-limosa, presentando una capacidad de drenaje adecuado (Del toro, 2015). Con base en estas características, el municipio de Ensenada presenta condiciones adecuadas para el cultivo de la vid. Por otra parte, la alta cantidad de sales disueltas en el agua de riego y la composición natural de los suelos favorece la salinidad de éste; por lo que es necesario prestar atención en la calidad del agua utilizada en el riego para no contribuir en un aumento de la salinidad de suelos y así afectar a los cultivos vinícolas.

2.2. Proceso de elaboración del vino

En el proceso de elaboración del vino es importante considerar que la concentración de algunos metabolitos de la uva está regulada principalmente por la etapa de maduración, tipo de suelo, luz, método de cultivo y temperatura ambiental, entre otros factores. En la Tabla 1 se muestran las principales etapas de la elaboración del vino, siendo la fermentación una etapa muy importante donde a través del metabolismo de las levaduras éstas transforman los azúcares contenidos en el jugo de la uva hasta obtener alcohol. Los factores que permiten clasificar los diferentes tipos vinos son: el tiempo de fermentación, el tipo de uva utilizada y las condiciones ambientales, que favorecen ciertas características como los grados de alcohol. Por ejemplo, el color del vino tinto es responsable de las antocianinas, que le dan una tonalidad de color rojo púrpura (Carrau *et al.*, 2012). Un factor importante en la cosecha de las uvas es la madurez, para ello es indispensable medir la cantidad de azúcares, esta medición se logra utilizando la escala Brix. Un Brix equivale aproximadamente a 1 g de sacarosa por cada 100 g de jugo. Para los vinos blancos se utilizan cosechas entre 21 y 23 Brix, mientras que para los tintos entre 23 y 25 Brix (Garritz, 2011).

Tabla 1 Etapas de la elaboración del vino (López y Sotelo, 2014).

Cosecha	Es la primera etapa del proceso en el cual se inicia con la cosecha de los racimos de las uvas (también llamado vendimia). Esta etapa no tiene una fecha exacta de inicio, ya que, depende totalmente del tipo de uva y las condiciones climatológicas en las que se encuentre la vid.
Despalillado	En esta operación se separan las uvas del raspón, además de las hojas.
Molienda	Durante esta etapa se separan las uvas, las cuales se someten a un proceso de prensado para así pasar a la fermentación, ya que, esta se realiza con el jugo y la piel de la uva.
Fermentación	Químicamente se define como la transformación del azúcar de las uvas en alcohol, esta se realiza antes del prensado en caso de vinos tintos; y después de este en caso de vinos blancos. Esta etapa dura aproximadamente entre siete y diez días. De acuerdo con el tipo de fermentación utilizada, los vinos se clasifican en vinos de mesa, vinos espumosos y vinos generosos.
Prensado	Este consiste en la separación de la fase sólida de la fase líquida del producto de la fermentación (dependiendo del caso). Según la presión empleada será la calidad del vino.
Añejamiento	Es el periodo comprendido entre el fin de la fermentación y el momento del consumo (sólo para vinos tintos) y para ello se emplean barricas de roble, tanques de madera, tanques de acero inoxidable.
Estabilización	Esta etapa tiene la finalidad de evitar la precipitación de los ácidos orgánicos propios del vino, a condiciones de temperatura baja aproximadamente por un periodo de quince días.
Filtración	Elimina las partes sólidas que aún permanecen en suspensión en el vino.
Embotellado	El producto final (vino) se embotella, ya sea para su añejamiento o para su consumo

2.3. Residuos agropecuarios y agroindustriales

Es importante señalar que un residuo es todo aquel material en estado sólido, líquido o gaseoso, que resulta de un proceso de extracción, transformación, fabricación o consumo, y del cual el poseedor de éste decide o tiene la obligación de desechar. Los residuos o subproductos son generados en cualquier proceso productivo, los cuales no son de utilidad posteriormente para la cadena de producción como materia prima (Rosas y Ortiz, 2016). Los residuos generados por las actividades primarias son todos aquellos que se dan a causa de la agricultura, ganadería, pesca, actividad forestal; y los agroindustriales son aquellos producidos por la industria alimenticia. En el caso de la industria vinícola, se generan diferentes tipos de residuos entre los que destacan: los residuos de cosecha de la vid, los raspones y el orujo (piel y semillas de la uva). En la Figura 2, se muestran las principales etapas del proceso de vinificación donde se generan los residuos. Cabe destacar que los residuos vinícolas pueden ser aprovechados si se les da un pretratamiento adecuado, y así ofrecer alternativas para la obtención de productos de interés económico como antocianinas, resveratrol y hormonas de crecimiento que podrían utilizarse en el control biológico y potenciadores de crecimiento de cultivos.

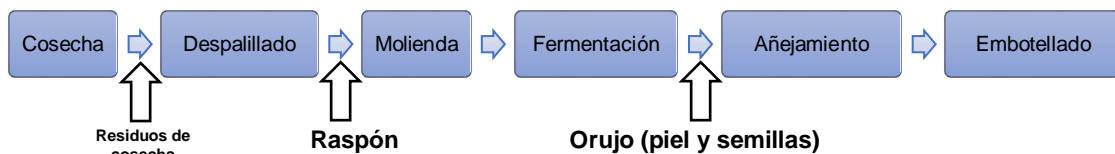


Figura 2. Residuos vinícolas generados durante el proceso de obtención del vino.

2.4. Pretratamientos de residuos agropecuarios y agroindustriales

Se conocen diferentes métodos para el pretratamiento de los residuos agropecuarios y agroindustriales. Entre los que se incluyen pretratamientos físicos, químicos, y biológicos (Grande, 2016), los cuales se seleccionan de acuerdo con las características físicas y químicas de los residuos. Además de considera el proceso al que se someterán para su revalorización o tratamiento. En la Figura 3, se muestran los principales pretratamientos físicos, químicos y biológicos empleados para el procesamiento de los residuos.

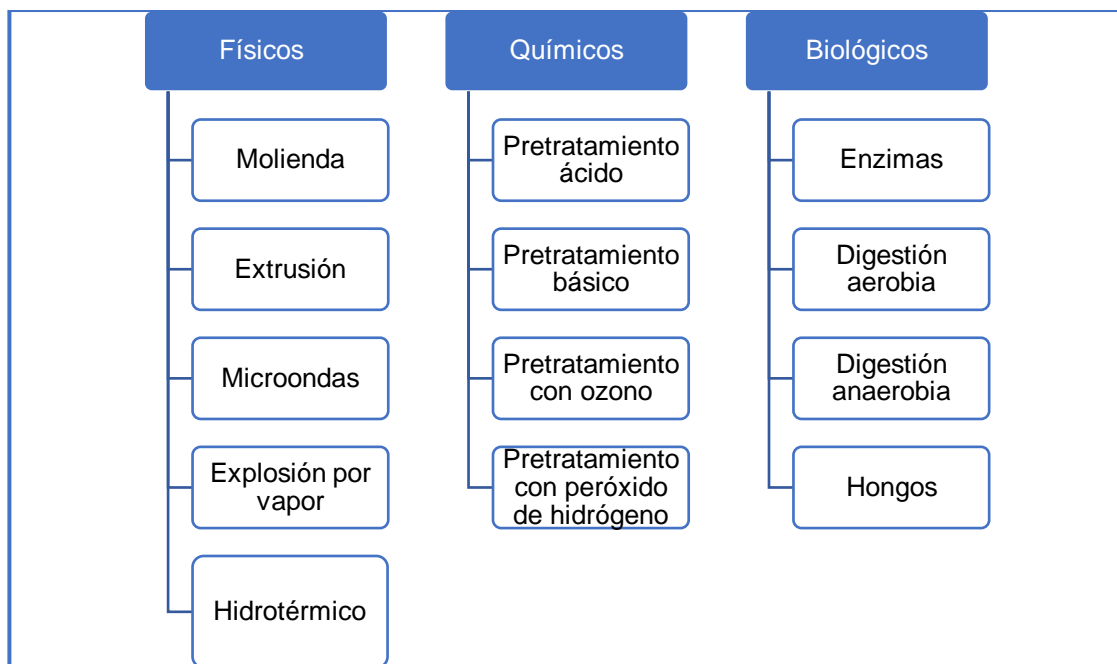


Figura 3. Diferentes pretratamientos para el procesamiento de los residuos agroindustriales.

Los pretratamientos físicos se utilizan con el fin de reducir el tamaño de partícula de los residuos, y así aumentar la superficie de contacto para facilitar los procesos de hidrólisis o biológicos. Sin embargo, su principal desventaja son los altos costos de energía que impactan en los costos de producción del producto de valor agregado que se desea obtener. Cabe destacar que el método de explosión por vapor combina un tratamiento térmico, mecánico y químico cuyo objetivo es romper la estructura lignocelulósica de los residuos

vegetales debido al rompimiento de enlaces glucosídicos (Grande, 2016). Por otra parte, los pretratamientos químicos se caracterizan por promover la hidrólisis de la celulosa, hemicelulosa y lignina de los residuos agrícolas empleando diferentes ácidos (ácido sulfúrico, clorhídrico, nítrico, y fosfórico) (Taherzadeh y Karimi, 2007); bases (hidróxido de sodio y potasio) (Mosier, *et al.*, 2005), ozono (Sun y Cheng, 2002), organosolventes (Thring *et al.*, 1990) y peróxido de hidrógeno (Grande, 2016). Cabe destacar que los pretratamientos químicos son ampliamente utilizados en la industria, pero su principal desventaja son los altos costos y la necesidad de infraestructura resistente a la corrosión.

Finalmente, los tratamientos biológicos se basan en el uso de microorganismos capaces de biodegradar la celulosa y lignina (Carvalho, 2008). Entre los microorganismos más destacados para este fin se encuentran los hongos de la podredumbre blanda blancos, grises y cafés (Domínguez *et al.*, 2014).

2.5. Aprovechamiento de residuos vinícolas

Los residuos agroindustriales son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar productos con un alto valor económico, de interés comercial y/o social. Entre los principales productos destacan la producción de biocombustibles como el metano, alcoholes, biodiesel, dióxido de carbono entre otros (Vargas, 2018). Asimismo, los residuos agroindustriales son sustratos adecuados para la producción de enzimas, con gran aplicación en la industria alimentaria, manufacturera, cosmética y farmacéutica, entre otras. Entre las enzimas más importantes producidas a partir de estas materias primas se encuentran las hemicelulasas, las celulasas, las pectinasas y las xilanasas, las cuales tienen un amplio espectro de aplicación (Grande, 2016). En el caso de la industria vinícola, aproximadamente el 80 % de la producción total de uva es destinada para la producción de vino, donde los residuos generados corresponden al 13 % del total de la fruta (Pinelo *et al.*, 2006). Los

principales residuos generados durante la producción del vino son la pulpa, los orujos (integrados por semillas y cáscaras) y tallos. Cabe destacar que estos residuos se caracterizan por ser ricos en alcoholes, ácidos orgánicos, aldehídos, ésteres, pectinas, polifenoles, vitaminas, minerales y azúcares reductores. Por consiguiente, de estos residuos se pueden obtener alcoholes, antocianinas, catequinas, glicósidos flavonoides, ácidos fenólicos, tartratos, etanol, ácido cítrico, aceite de semilla, fibra dietaria e hidrocoloides a través de métodos extractivos (Pinelo *et al.*, 2006). Estudios recientes a nivel nacional demuestran la investigación desarrollada en la identificación y aprovechamiento de los compuestos bioactivos presentes en los residuos vinícolas. Por ejemplo, Sánchez *et al.*, (2002) evaluaron la biodegradación de residuos vinícolas por *Pleurotus* para obtener alimentos de fácil digestión para el ganado. Asimismo, Botella, (2005) reportó el empleo de los desechos de la uva como materia prima para la fermentación y producción de enzimas hidrolíticas (celulasas, xilanasas y pectinasas) por *Aspergillus awamori*. Por otro lado, Chaparro-Mercado *et al.*, (2014) evaluaron las propiedades nutraceuticas y funcionales de las semillas de la uva. En el caso de Agustin-Salazar *et al.*, (2014) identificaron compuestos fenólicos en extractos del orujo de *Vitis vinifera* L, y evaluaron la capacidad antioxidante de los residuos provenientes de la casa Pedro Domecq en Sonora. Por otra parte, Oliveira *et al.*, (2015) identificaron antocianinas y pigmentos derivados de las antocianinas en orujo de uva roja, empleada principalmente para la elaboración del vino tinto en Sonora. Recientemente, Garcia-Becerra *et al.*, (2016) realizaron bioensayos para medir la actividad antioxidante de dos extractos de residuos vinícolas de Aguascalientes, obteniendo resultados positivos en eritrocitos.

III. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de la industria vinícola en el Valle de Guadalupe ha originado una rápida expansión turística y empresarial. Sin embargo, en el proceso de elaboración del vino se genera una gran cantidad de residuos orgánicos que carecen de un tratamiento adecuado para su disposición final. El residuo generado en la industria del vino se denomina orujo y está constituido por hollejos (pieles) y semillas de la uva. El orujo es el 15-40% del peso total de la uva y contiene concentraciones importantes de mosto, azúcares, ácido tartárico, taninos y otros constituyentes (Fabbri *et al.*, 2015). En el caso particular de Baja California, la Secretaría de Desarrollo Agropecuario reportó que en 2015 se cosecharon cerca de 3837 hectáreas de uva, y aproximadamente se obtuvieron 10 toneladas de uva por hectárea; lo que significa que se generaron cerca de 5756 toneladas de residuos vinícolas. Cabe destacar que estos residuos representan un foco de contaminación para el medio ambiente al no desarrollarse estrategias para su aprovechamiento. En la actualidad, el aprovechamiento de los residuos agroindustriales ha ganado interés entre la comunidad científica e industrial originando el desarrollo de la “bioeconomía” enfocada a la producción de fuentes de energía, nuevos materiales y otros bioproductos de interés comercial a partir de los residuos (Guy *et al.*, 2014). En el caso de los residuos vinícolas, se han desarrollado estrategias para su aprovechamiento en el área farmacéutica, cosmética y/o energética (Makris *et al.*, 2007; Peixoto *et al.*, 2018); debido a los compuestos bioactivos que contienen (taninos, ácido tartárico, polifenoles, antocianinas). Sin embargo, las tecnologías empleadas para la extracción de estos compuestos son costosas por las etapas de purificación solicitadas en la industria farmacéutica y cosmética. Por lo tanto, es necesario buscar alternativas de aprovechamiento de los residuos vinícolas en otras áreas de aplicación. Por ejemplo, en el área agrícola aprovechando la capacidad nutricional y antimicrobiana de los azúcares y fenoles contenidos en los orujos

de la uva. Por tal motivo, este trabajo contribuirá en la generación de conocimiento científico sobre el aprovechamiento de los residuos vinícolas del Valle de Guadalupe para la generación de productos de alto valor agregado.

|

IV. HIPÓTESIS

Los compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados de residuos vinícolas de Baja California favorecen la germinación de semillas y el desarrollo de cultivos agrícolas, así como la inhibición de hongos fitopatógenos.

|

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar la funcionalidad de los hidrolizados provenientes de residuos vinícolas de Baja California sobre el desarrollo de cultivos agrícolas y la inhibición de hongos fitopatógenos.

5.2. Objetivos Particulares

- Evaluar diferentes pretratamientos físicos y químicos para el procesamiento de residuos vinícolas (orujo de uva para vino tinto, rosado y blanco) del Valle de Guadalupe, y la obtención de hidrolizados ricos en nutrientes y/o compuestos bioactivos.
- Caracterizar fisicoquímicamente los hidrolizados de residuos vinícolas (orujo de uva para vino tinto, rosado y blanco) generados en el Valle de Guadalupe.
- Evaluar el efecto de los hidrolizados de residuos vinícolas sobre la germinación de semillas de importancia regional.
- Evaluar la actividad antifúngica de los hidrolizados de residuos vinícolas contra hongos fitopatógenos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Muestreo de residuos vinícolas

El muestreo de los residuos vinícolas se realizó durante los meses de septiembre y octubre de 2017 en dos plantas viticultoras del Valle de Guadalupe en Ensenada, Baja California. Se tomaron muestras representativas de 10 kg de orujo de vino tinto y vino blanco de la empresa L.A. Cetto®, y de orujo de vino rosado de la vinícola Xecue®. Los residuos vinícolas fueron almacenados en bolsas ziploc a -20°C con oscuridad constante hasta su utilización.

6.2. Obtención de polvos de residuos vinícolas

El procedimiento consistió en pesar 200 g de cada uno de los orujos frescos de vino rosado, vino tinto y vino blanco. Se separaron los hollejos (o piel) y las semillas. Se registró de manera independiente el peso húmedo de las semillas y de los hollejos empleando una balanza analítica (VIBRA, Mod. HT224RCE). Las fracciones se secaron en un horno a 80°C durante 48 h (Grieve, Mod. 0-201C). Transcurrido el tiempo de secado, se registró el peso de las fracciones (semillas y hollejos). Posteriormente, se mezclaron las semillas y los hollejos en un mortero y se procedió a su molienda hasta la obtención de un polvo con tamaño de partícula menor a 1 mm de diámetro. Los polvos se almacenaron a temperatura ambiente en tubos de plástico de 50 mL y en oscuridad hasta su uso.

6.3. Obtención de hidrolizados de residuos vinícolas

Se prepararon 200 mL de hidrolizado de cada uno de los orujos recolectados (vino rosado, vino tinto y vino blanco). Cabe destacar que para la obtención de los hidrolizados se empleó el método descrito por Tzintzun et al., (2016) con ciertas modificaciones. El procedimiento consistió de cuatro etapas de hidrólisis que se describen a continuación:

6.3.1 Primera etapa: Se pesaron 2 g de polvo de residuos vinícolas y se añadieron a 200 mL de agua destilada. Posteriormente, se adicionó a la mezcla 2 mL de ácido clorhídrico al 37% (v/v), y se mantuvo en agitación constante en una parrilla durante 30 min. Se tomó una muestra de 1 mL para la determinación de azúcares reductores.

6.3.2 Segunda etapa: La mezcla de polvo acidulada fue sometida a un tratamiento térmico de alta presión para la obtención de un hidrolizado rico en azúcares reductores. Los frascos con el polvo acidulado se colocaron en una autoclave (Novatec, Mod. EV-30) y se mantuvieron a 121°C, 15 psi durante 15 min. Posteriormente, se tomaron muestras de 1 mL para la determinación de azúcares reductores.

6.3.3 Tercera etapa: Consistió en el ajuste de pH de cada uno de los hidrolizados hasta obtener un valor de pH de 7.0 ± 7.2 empleando una solución de hidróxido de sodio al 30 % y 1% (p/v). Posteriormente, los hidrolizados se filtraron con una bomba de vacío para la eliminación de los residuos sólidos. Se tomaron muestras de 1 mL para la determinación de azúcares reductores.

6.3.4 Cuarta etapa: Los hidrolizados se sometieron a un segundo tratamiento térmico de alta presión. Los frascos se mantuvieron a 121°C, 15 psi durante 15 min en la autoclave. Posteriormente, se tomaron muestras de 1 mL para la determinación de azúcares reductores. El hidrolizado resultante se mantuvo a 4°C bajo condiciones estériles.

6.4. Determinación de azúcares reductores

Con el fin de evaluar la eficiencia del método de hidrólisis de los residuos vinícolas, se realizó la cuantificación de azúcares reductores en los hidrolizados. Se empleó el método modificado del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Cabe destacar que se preparó una curva patrón de glucosa (0 a 1 g/L) como estándar para la cuantificación de azúcares reductores.

En primer lugar, se realizaron diluciones de los hidrolizados con agua destilada estéril para obtener lecturas dentro del rango de trabajo de la curva patrón. Posteriormente, se mezcló 1 mL de hidrolizado con 1 mL de reactivo DNS; los tubos se agitaron en el vórtex durante 30 s. Después, los tubos se incubaron en baño María en ebullición durante 15 min. Se adicionó a cada tubo 8 mL de agua destilada y se agitó en un vórtex. Finalmente, se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible (Genesys 10Vis, Thermo Fisher Scientific Inc.) a 575 nm, calibrando a cero con el blanco (agua destilada y reactivo DNS).

6.5. Determinación de azúcares totales

Otro parámetro que se empleó para evaluar la eficiencia del método de hidrólisis de los residuos vinícolas fue la concentración de azúcares totales. Se empleó el método modificado de Fenol-Sulfúrico descrito por Dubois (1956). Cabe destacar que se preparó una curva estándar de sacarosa empleando concentraciones en un rango de 0.1 a 0.5 g/L.

El procedimiento consistió en mezclar 1 mL de hidrolizado diluido con 1 mL de una solución de fenol al 5% (p/v). Posteriormente, se adicionaron 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98% v/v). Las muestras se incubaron en un baño de hielo y oscuridad durante 15 min. Finalmente, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-Visible empleando una longitud de onda de 490 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.6. Determinación de fenoles totales

Con el objetivo de obtener hidrolizados ricos en compuestos bioactivos, se determinó la concentración de fenoles totales empleando el método modificado de Lapornik *et al.*, (2005). La reacción se llevó a cabo mezclando 100 μL de hidrolizado con 500 μL del reactivo de Folin- Ciocalteau (1N). Las muestras se incubaron a temperatura ambiente y oscuridad durante 5 min. Después, se adicionaron 400 μL de una solución de carbonato de sodio (1 N) y se incubó a temperatura ambiente y oscuridad durante 30 min. Finalmente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm observando un cambio de coloración en los tubos de amarillo a azul. Para cuantificar la concentración de fenoles totales en las muestras, se empleó la ecuación de la curva patrón de ácido gálico (0.05 a 0.25 mg/mL).

6.7. Ensayos de germinación de semillas empleando hidrolizados de residuos vinícolas

Se evaluó la funcionalidad del hidrolizado de orujo de vino rosado sobre la germinación de seis semillas (acelga, albahaca, cebollín, lechuga, rábano y chile serrano). Se empleó un diseño factorial completamente al azar con dos factores: (i) tipo de semilla (con 6 niveles) y (ii) tratamiento (control e hidrolizado de vino rosado), para cada tratamiento se emplearon 25 réplicas. El control consistió en agua destilada. Los ensayos control se desarrollaron colocando 25 semillas en una sanita absorbente de manera equidistante. Se asperjó agua destilada sobre las semillas para fijarlas, y se taparon con otra sanita. Nuevamente, se asperjó agua destilada sobre las sanitas y se enrollaron. La sanita se colocó en una bolsa ziploc y se colocó en una cámara ambiental con ciclos de luz- oscuridad de 12 h a una temperatura de 22-25 °C. Los ensayos de germinación con el hidrolizado de orujo de vino rosado se desarrollaron sumergiendo las semillas en 10 mL de hidrolizado durante 5 min. Posteriormente, las semillas se colocaron en una sanita absorbente de manera equidistante. Se asperjó agua destilada sobre las semillas para

fijarlas, y se taparon con otra sanita. Nuevamente, se asperjó agua destilada sobre las sanitas y se enrollaron. La sanita se colocó en una bolsa ziploc y se colocó en una cámara ambiental con fotoperiodos de 12 h a una temperatura de 22-25° C. Las variables de respuesta que se monitorearon a lo largo del periodo de germinación fueron: porcentaje de germinación, longitud de raíces, longitud de parte aérea y aparición de hojas.

6.8. Evaluación de la actividad antifúngica de los hidrolizados de residuos vinícolas

Se evaluó la funcionalidad de los hidrolizados de orujo de vino tinto, rosado y blanco para el control de tres hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*, *Alternaria* spp., y *Botrytis* spp. Se prepararon cajas Petri con 25 mL de tres medios de cultivo: a) medio PDA (Agar Papa Dextrosa) (medio control), b) medio PDA suplementado con hidrolizado (tinto, rosado o blanco según corresponda), c) medio con hidrolizado (tinto, rosado o blanco según corresponda).

La preparación de los medios de cultivo evaluados en este estudio fue la siguiente:

- a) **Medio PDA:** se disolvieron 39 g de polvo PDA en 1 L de agua destilada. Posteriormente, se calentó y agitó hasta ebullición para su disolución. Finalmente, se esterilizó a 121 °C, 15 psi durante 15 min. El medio se distribuyó en cajas Petri estériles desechables.
- b) **Medio PDA suplementado con hidrolizado:** se preparó una infusión de papa (100 g de papa en 300 mL de agua destilada, calentar hasta ebullición). Posteriormente se realizó una filtración del caldo. Se mezclaron 100 mL de hidrolizado (vino tinto, rosado o blanco) con 100 mL de la infusión de papa. Se esterilizó el medio a 121 °C, 15 psi durante 15 min.

- c) **Medio con hidrolizado:** se preparó adicionando 15 g de agar a 1 L del hidrolizado en estudio (vino tinto, rosado o blanco). Se calentó y agitó para la completa disolución. Posteriormente, se esterilizó el medio a 121 °C, 15 psi durante 15 min. Finalmente, se distribuyó el medio en cajas Petri estériles desechables.

Una vez preparadas las cajas, los hongos fitopatógenos (discos de agar de 5 mm de diámetro) se sembraron en los diferentes medios de cultivo. Las cajas se incubaron a 30°C y se evaluó la inhibición del crecimiento de los hongos a lo largo de 14 días de incubación.

6.9. Análisis estadístico

Las determinaciones se realizaron por triplicado y los datos generados se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA). Con el objetivo de determinar las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, se realizó un análisis aplicando la prueba de Tukey-Kramer con un nivel de significancia de 0.5 ($\alpha \leq 0.5$). El análisis estadístico se desarrolló empleando el paquete estadístico NCSS versión 2007.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Caracterización másica de los residuos vinícolas

En este estudio se realizó la caracterización másica de los orujos de uva para vino tinto, vino rosado y vino blanco para determinar la composición de los residuos vinícolas. Como se muestra en la Figura 4, el principal componente en los orujos evaluados fue el agua, seguido de hollejos y semillas. Las variaciones en la composición de los orujos pueden explicarse por su forma de obtención, es decir, el orujo de vino tinto se obtuvo directamente de los tanques de fermentación. En la producción de vino tinto la uva se coloca directamente en los tanques de fermentación, la uva no es prensada. En comparación con el proceso de elaboración del vino rosado y blanco, las uvas son prensadas inicialmente para extraer el jugo.

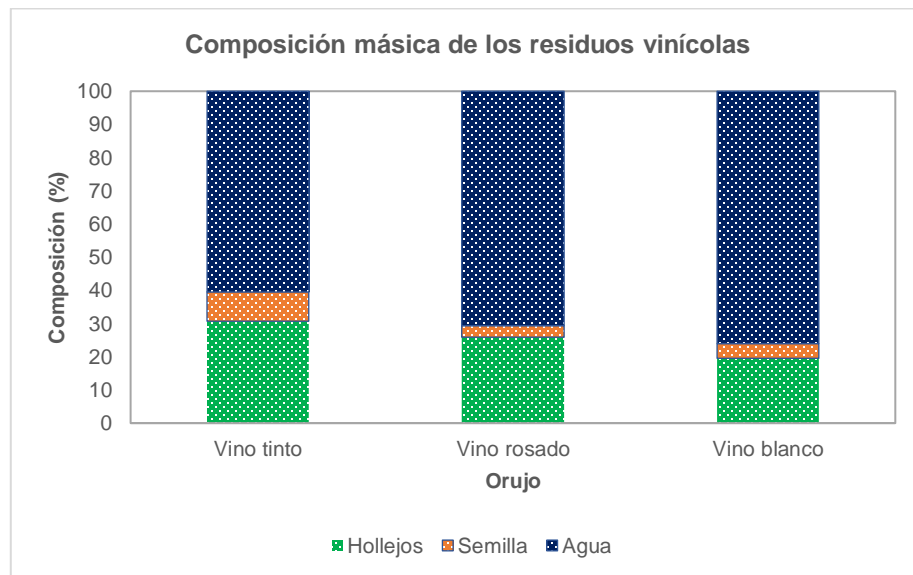


Figura 4. Composición másica de los orujos de uva para vino tinto, rosado y blanco obtenidos de industrias vinícolas del Valle de Guadalupe en Ensenada, Baja California.

7.2. Evaluación del proceso de hidrólisis de los residuos vinícolas

Con el objetivo de evaluar un pretratamiento adecuado para someter a los orujos de uva (vino tinto, rosado y blanco), y obtener hidrolizados ricos en compuestos nutritivos y bioactivos, se evaluó un pretratamiento de hidrólisis ácida y explosión con vapor para garantizar el rompimiento de polímeros de pared celular. En primer lugar, se analizó la concentración de azúcares reductores (Figura 5), observándose que la mayor concentración se obtuvo en el orujo de uva para vino rosado (8.12 ± 0.61 g/L), seguido del orujo de vino blanco (4.67 ± 0.48 g/L) y tinto (0.72 ± 0.05 g/L). Mientras que, en el caso de los azúcares totales, se obtuvo la mayor concentración en los orujos de vino rosado (13.22 ± 0.80 g/L) y blanco (13.78 ± 2.21 g/L), y la menor concentración en el orujo de vino tinto (2.90 ± 0.1 g/L). Estos resultados nos indican que con el tratamiento de hidrólisis se obtuvo un incremento en la concentración de azúcares derivado del rompimiento de los componentes de pared celular como polisacáridos, compuestos fenólicos y proteínas presentes en las semillas y hollejos de los residuos vinícolas (Ortega-Regules *et al.*, 2006). Por otra parte, la baja concentración de azúcares reductores y totales en el orujo de vino tinto puede explicarse porque este residuo proviene de la fermentación de la uva donde los azúcares son transformados a etanol. En comparación, los orujos de vino rosado y blanco provienen del proceso de prensado de las uvas para la extracción del jugo. Cabe destacar que existe una gran variedad de pretratamientos de los residuos agroindustriales entre los que se incluyen los tratamientos físicos, químicos, y biológicos (Saval, 2012). En este estudio los residuos vinícolas fueron sometidos a un tratamiento de hidrólisis ácida (tratamiento químico) seguido de una explosión con vapor (tratamiento físico). Como se observa en este estudio, la mezcla de pretratamientos favoreció el incremento en la concentración de azúcares reductores y totales, los cuales pueden emplearse como fuente de carbono para diferentes procesos biotecnológicos.

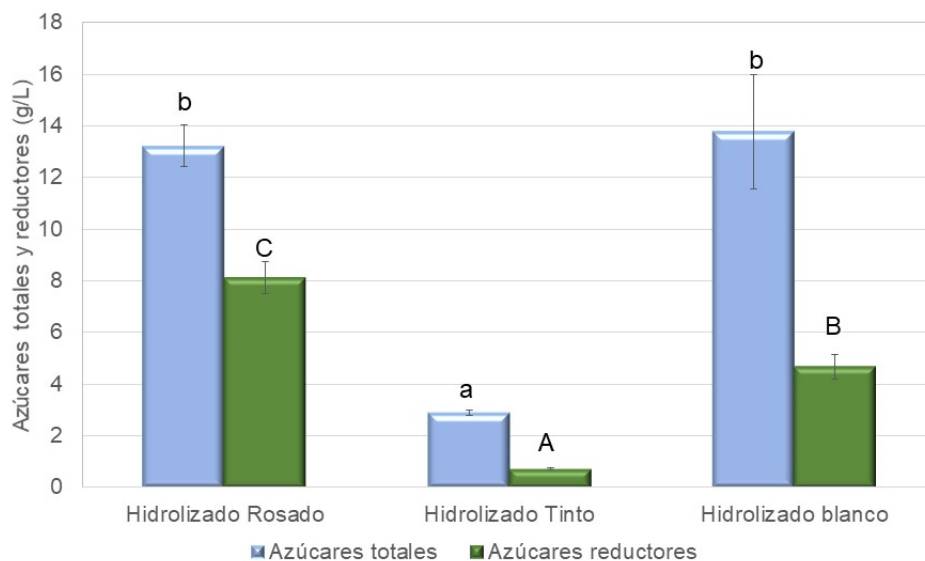


Figura 5. Concentración de azúcares reductores y totales en los hidrolizados de orujo de uva para vino tinto, rosado y blanco. Los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey-Kramer, $\alpha \leq 0.5$).

Por otra parte, uno de los polímeros presentes en la pared celular de los hollejos y semillas de los residuos agrícolas son los compuestos fenólicos. Por consiguiente, se determinó la concentración de fenoles totales en los hidrolizados de los residuos vinícolas. Como se observa en la Figura 6, la mayor concentración de fenoles totales se observó en el hidrolizado del orujo de vino tinto (0.32 ± 0.04 mg/mL), en comparación con el vino rosado (0.20 ± 0.01 mg/mL) y blanco (0.18 ± 0.01 mg/mL). Las diferencias observadas en la concentración de fenoles totales pueden explicarse principalmente por el tipo de variedad de la uva, el clima para su cultivo y la técnica de vinificación. En este estudio, se trabajó con la variedad de *Merlot* para el vino tinto, la variedad *Grenache* para el vino rosado y la variedad *Sauvignon Blanc* para el vino blanco. En trabajos previos se ha reportado que el vino tinto puede contener hasta 3000 mg/L de compuestos fenólicos (Landrault *et al.*, 2001). Estos

compuestos están agrupados en ácidos hidroxibenzoico, antocianinas, flavonoles y taninos (Van Leeuw *et al.*, 2014). Además, los compuestos fenólicos pueden ser utilizados como agentes antioxidantes al neutralizar radicales libres. Inclusive, se considera que el alto contenido de compuestos fenólicos en el vino tinto, presenta un mayor efecto protector en comparación con el vino rosado y blanco debido al alto contenido de compuestos antioxidantes liberados de los hollejos y semillas de las uvas (Van Leeuw *et al.*, 2014).

Por lo tanto, con la caracterización de los principales compuestos bioactivos presentes en los hidrolizados de los residuos vinícolas se observa que los extractos contienen compuestos que pueden emplearse para diferentes procesos biotecnológicos.

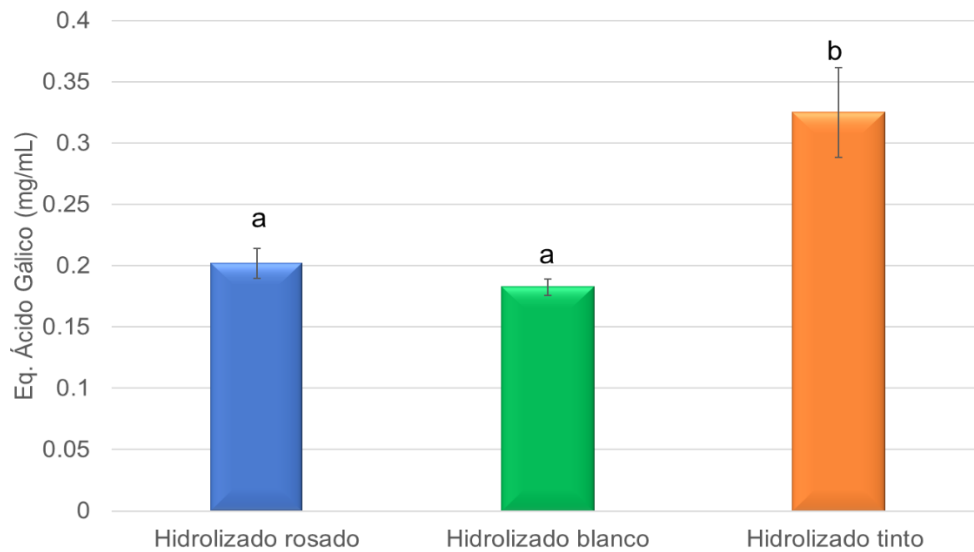


Figura 6. Concentración de fenoles totales (expresados como equivalentes de ácido gálico) en los hidrolizados de orujo de uva para vino tinto, rosado y blanco. Los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey-Kramer, $\alpha \leq 0.5$).

7.3. Efecto de los hidrolizados sobre la germinación de semilla

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de los hidrolizados de los residuos vinícolas, se evaluó el efecto de los extractos sobre la germinación de seis especies agrícolas. En los ensayos se evaluó el índice de germinación, así como el crecimiento de tallo y raíces de las plántulas.

7.3.1. Índice de germinación

Se evaluó el porcentaje de germinación de seis especies de semillas (*Beta vulgaris subsp. Vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Allium schoenoprasum*, *Lactuca sativa*, *Raphanus sativus* y *Capsicum annum*), sometidas a los tratamientos control y al hidrolizado de orujo de vino rosado a lo largo de 7 días de incubación (Figura 7). Cabe destacar que cada uno de los cultivos presentó tiempos de germinación diferentes debido a las características propias de las semillas. De acuerdo con lo reportado en la literatura el rábano presenta tiempos de germinación menores a 3 días, seguido de la lechuga con 7 días de germinación. Mientras que la acelga, albahaca, cebollín y chile serrano presentan días de germinación entre 10 a 15 días (Zárate-Aquino, 2014).

Como se observa en la Figura 7, las semillas de lechuga, albahaca y rábano germinaron al cabo de 3 días alcanzando porcentajes de germinación superiores a 60 %. Mientras que para la acelga, chile serrano y cebollín los tiempos de germinación fueron prolongados alcanzando porcentaje de germinación menores al 20% al cabo de 7 días de germinación (Figura 7a y 7b).

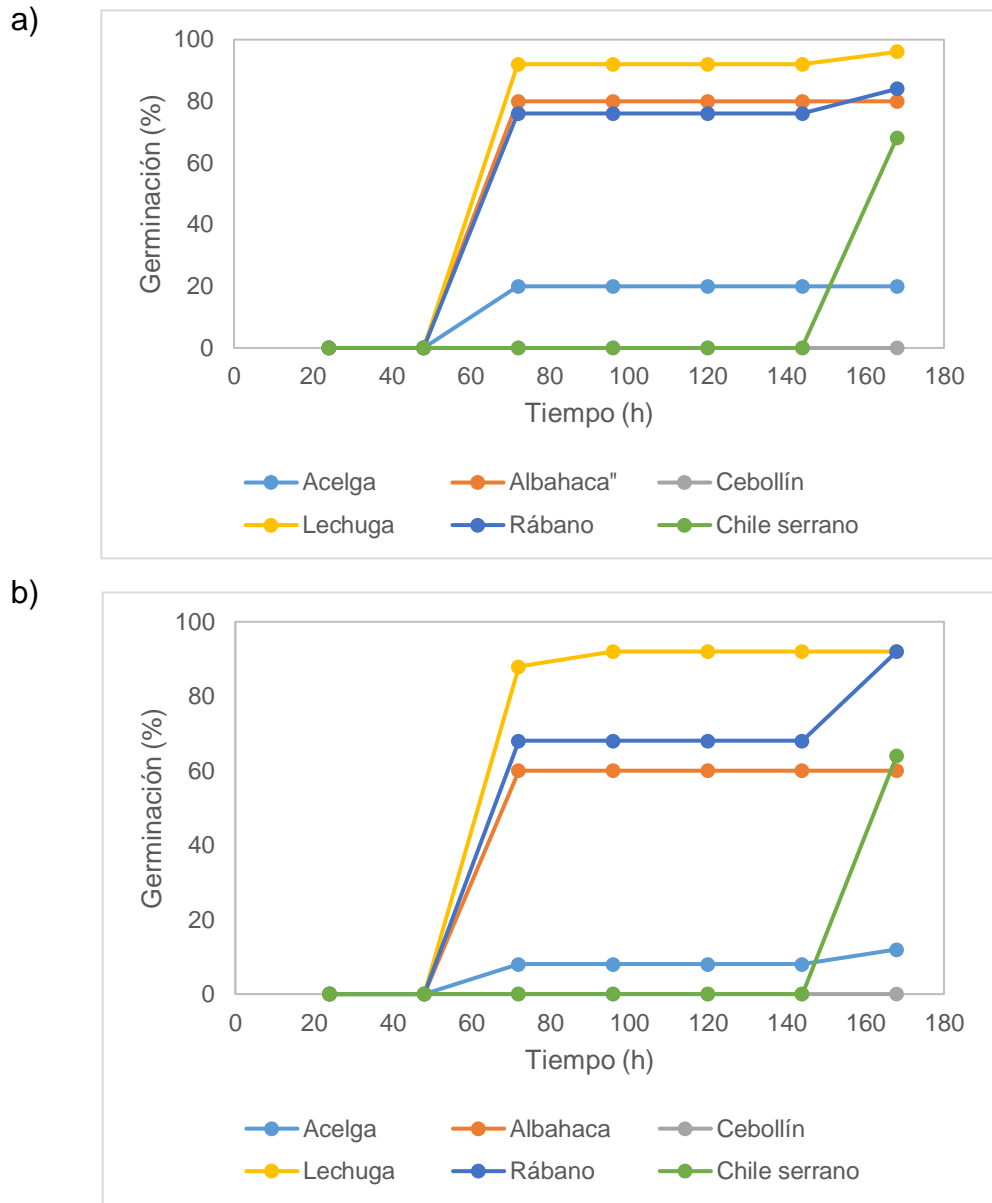


Figura 7. Índice de germinación de seis especies de semillas bajo diferentes tratamientos: **a)** Experimentos control (semillas tratadas con agua destilada), **b)** Experimentos con hidrolizado de orujo de vino rosado.

Al comparar el efecto del hidrolizado de orujo de vino rosado sobre la germinación de las semillas, se observó que la lechuga alcanzó porcentajes de germinación similares a los experimentos control ($92 \pm 4\%$). Mientras que la germinación de las semillas de rábano tratadas con hidrolizado fue superior en comparación con los experimentos control (92% y 84%, respectivamente). Sin embargo, la estimulación de la germinación de las semillas de albahaca y acelga fue menor con el hidrolizado (60 y 12 %, respectivamente) en comparación con los experimentos control (80 y 20%, respectivamente).

7.3.2. Crecimiento de tallos y raíces

Asimismo, se evaluó el efecto del hidrolizado de orujo de vino rosado sobre el crecimiento de raíces y parte aérea de las seis especies en estudio. Como se observa en la Figura 8, las semillas de lechuga tratadas con el hidrolizado presentaron un incremento en la longitud de las raíces en comparación con los experimentos control. Mientras que para la acelga, albahaca y rábano no se observaron diferencias significativas en la longitud de las raíces en comparación con los experimentos control.

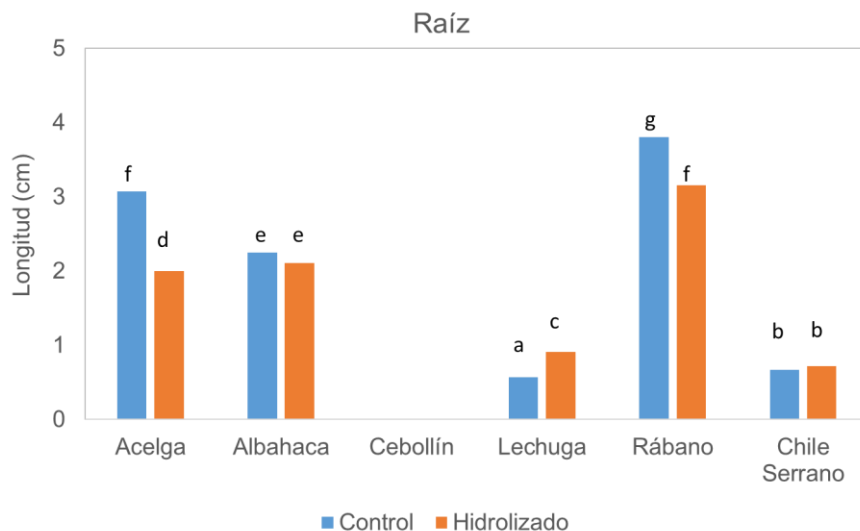


Figura 8. Efecto del hidrolizado de orujo de vino rosado sobre el crecimiento de las raíces de acelga, albahaca, cebollín, lechuga, rábano y chile serrano. Los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey-Kramer, $\alpha \leq 0.5$).

Por otra parte, se evaluó el efecto del hidrolizado sobre el crecimiento de los tallos o parte aérea de las seis especies de semillas seleccionadas. Como resultado se observó que la longitud de los tallos de la acelga tratada con el hidrolizado fue superior a los experimentos control (Figura 9). Mientras que para el resto de las semillas no se observaron diferencias significativas entre los experimentos control y los hidrolizados.

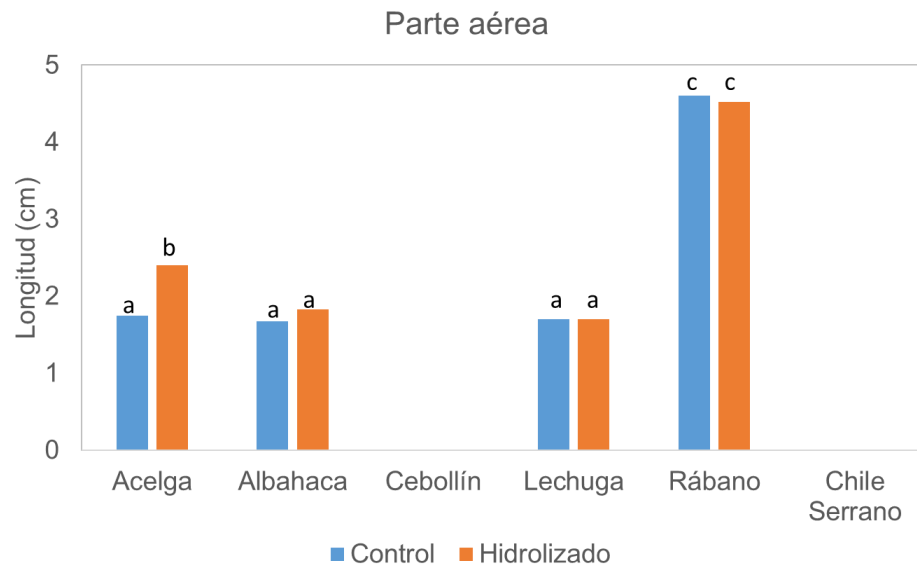


Figura 9. Efecto del hidrolizado de orujo de vino rosado sobre el crecimiento de la parte aérea de acelga, albahaca, cebollín, lechuga, rábano y chile serrano. Los tratamientos con letra diferentes son significativamente diferentes (Prueba Tukey-Kramer, $\alpha \leq 0.5$).

Como se observa en este estudio, los hidrolizados provenientes de residuos vinícolas mostraron un efecto positivo en la germinación y elongación de tallos y/o raíces del rábano y lechuga. Estos resultados pueden explicarse debido al alto contenido de carbohidratos contenidos en el hidrolizado de orujo de vino rosado (13.22 ± 0.80 g/L de azúcares totales). Cabe destacar que la pared celular de la semilla y piel de la uva están formados por celulosa y hemicelulosa y al someterse a un pretratamiento de hidrólisis favoreció su

rompimiento para la obtención de monosacáridos de fácil asimilación por la semilla. En este sentido, estudios previos han identificado la presencia de manosa, galactosa y glucosa como los principales carbohidratos constituyentes de la pared celular de los residuos de uva (hollejos y semillas) de las variedades *Cabernet Sauvignon*, *Syrah* y *Monastrell* (Apolinar-Valiente *et al.*, 2015).

7.4. Efecto de los hidrolizados en el control de hongos fitopatógenos

En este estudio se evaluó la funcionalidad de los hidrolizados en el control de tres hongos fitopatógenos a nivel *in vitro*. Como resultado se observó una inhibición en el crecimiento radial y esporulación de los tres hongos evaluados (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria spp.*, y *Botrytis spp.*) con los hidrolizados de vino tinto, rosado y blanco. En el caso de *F. oxysporum* se observó una mayor inhibición empleando el medio a base de hidrolizado de vino rosado, seguido del vino blanco y vino tinto (Figura 10). Por otra parte, para *Alternaria spp.* se observó una mayor inhibición en el crecimiento empleando el hidrolizado de vino tinto, seguido del vino rosado y vino blanco (Figura 11). Finalmente, en el caso de *Botrytis spp.* se observó que este cultivo fue más sensible al hidrolizado de vino rosado, seguido del vino tinto y vino blanco (Figura 12). La efectividad de los hidrolizados para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos se puede explicar debido al contenido de compuestos fenólicos. En este estudio se observó una mayor concentración de fenoles en el hidrolizado de orujo de vino tinto (0.32 ± 0.04 mg/mL), seguido del vino rosado (0.20 ± 0.01 mg/mL) y blanco (0.18 ± 0.01 mg/mL). Los compuestos fenólicos son metabolitos producidos por la uva y están involucrados en los mecanismos de defensa de la planta contra agentes fitopatógenos. Estos compuestos se encuentran en las semillas, hollejos y pulpa de la uva (Friedman, 2014). Cabe destacar que existen diferentes reportes donde se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los compuestos bioactivos (principalmente fenoles) de la uva y sus subproductos en contra de bacterias patógenas, virus y hongos

(Friedman, 2014; Rodríguez-Vaquero *et al.*, 2013; Vaz *et al.*, 2010). De esta forma ha sido posible identificar que los principales fenoles presentes en los residuos vinícolas son: flavonoides, catequinas, flavanoles, polifenoles [(+) - catequina, (-) - epicatequina, galato de epicatequina, procianidinas B1 y B2, quercetina glucosilada, resveratrol, piceido y astringina] (Katalinic *et al.*, 2010). Es importante mencionar que los compuestos fenólicos actúan de diferente forma dependiendo del tipo de microorganismo. Por ejemplo, Jayaprakasha *et al.*, 2003 evaluaron extractos de semilla de uva y concluyeron que los extractos fueron muy efectivos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *L. innocua*, y *B. thermosphacta*) en comparación con las bacterias Gram negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, y *S. enterica*) (Badet, 2011; Delgado-Adámez *et al.*, 2012).

En el presente estudio se observó que el hidrolizado de orujo de vino rosado fue más efectivo para inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* y *Botrytis* spp. Mientras que para *Alternaria* spp. se observó una mayor inhibición con el hidrolizado de orujo de vino tinto. Por tal motivo, son necesarios estudios enfocados a identificar los principales compuestos fenólicos en cada uno de los hidrolizados para entender los mecanismos de acción y explicar el grado de inhibición en los hongos fitopatógenos estudiados. Asimismo, es importante destacar que este trabajo es evidencia del potencial de los hidrolizados para el control de hongos fitopatógenos aprovechando residuos vinícolas.

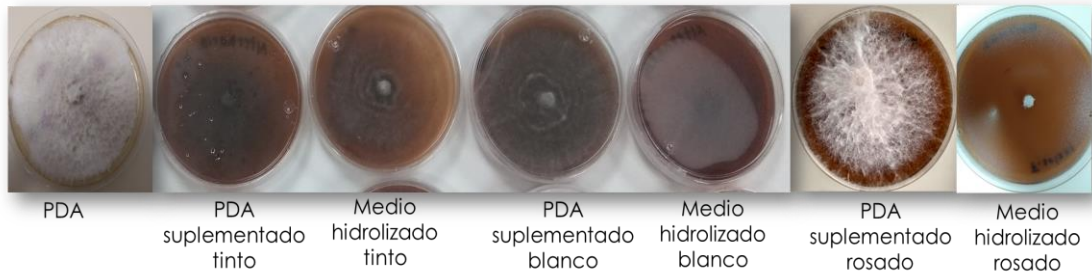


Figura 10. Ensayos de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* empleando hidrolizados de orujo de vino rosado, tinto, blanco, y medio PDA suplementado con los hidrolizados correspondientes.

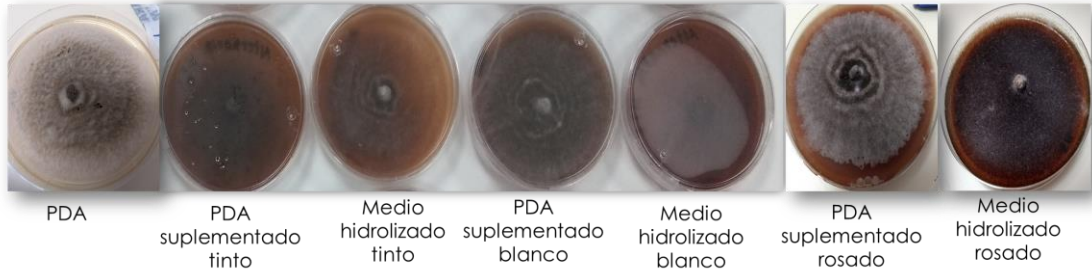


Figura 11. Ensayos de inhibición del crecimiento de *Alternaria* spp. empleando hidrolizados de orujo de vino rosado, tinto y blanco, y medio PDA con los hidrolizados correspondientes.

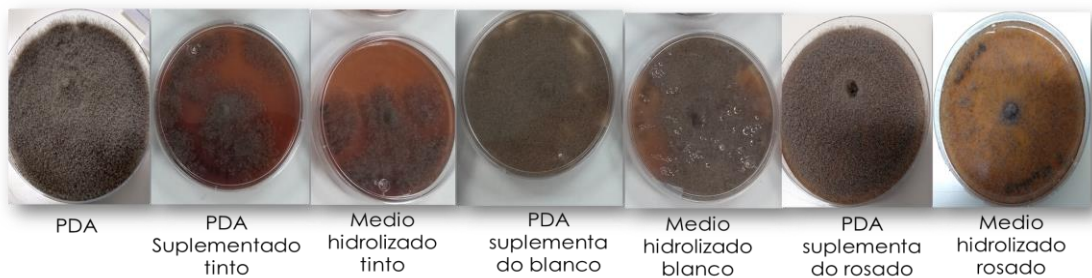


Figura 12. Ensayos de inhibición del crecimiento de *Botrytis* spp. empleando hidrolizados de orujo de vino rosado, tinto y blanco, y medio PDA con los hidrolizados correspondientes.

VII. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se observó que el sometimiento de los residuos vinícolas a un tratamiento de hidrólisis ácida seguido de un proceso térmico a alta presión favoreció la obtención de hidrolizados ricos en compuestos bioactivos, como azúcares y compuestos fenólicos. La concentración de azúcares reductores y totales fue mayor en los hidrolizados de orujo vino rosado (8.12 ± 0.61 g/L y 13.22 ± 0.80 g/L, respectivamente), seguido del orujo de vino blanco (4.67 ± 0.48 g/L y 13.78 ± 2.21 g/L, respectivamente) y tinto (0.72 ± 0.05 g/L y 2.90 ± 0.1 g/L). En cuanto a la concentración de fenoles totales se obtuvo una mayor concentración en el hidrolizado de vino tinto (0.32 ± 0.04 mg/mL), en comparación con el vino rosado (0.20 ± 0.01 mg/mL) y blanco (0.18 ± 0.01 mg/mL).

Con base en las pruebas de funcionalidad de los hidrolizados de los residuos vinícolas, se concluye que el hidrolizado de vino rosado estimuló la germinación de semillas de lechuga y rábano en comparación con los experimentos control. Por otra parte, al evaluar la funcionalidad de los hidrolizados en el control de tres hongos fitopatógenos se observó que el hidrolizado de orujo de vino rosado fue más efectivo para inhibir el crecimiento y esporulación de *F. oxysporum* y *Botrytis* spp. Mientras que para *Alternaria* spp. se observó una mayor inhibición con el hidrolizado de orujo de vino tinto.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo son evidencia de la presencia de compuestos bioactivos presentes en los residuos vinícolas del Valle de Guadalupe. Así como de las estrategias de aprovechamiento de los hidrolizados vinícolas en el área agrícola, principalmente, en la germinación de semillas y control de hongos fitopatógenos.

De esta manera este trabajo pretende contribuir a la generación de conocimiento científico e investigación aplicada relacionada al aprovechamiento de residuos agroindustriales generados en Baja California.

IX. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo fue posible corroborar que al someter los orujos derivados de la uva para vino tinto, rosado y blanco a un tratamiento de hidrólisis ácida seguida con arrastre de vapor fue posible obtener hidrolizados ricos en compuestos bioactivos como azúcares (reductores y totales) y fenoles totales. Por lo que se sugiere que se realicen investigaciones futuras en identificar químicamente los azúcares y fenoles contenidos en cada uno de los hidrolizados, a través de métodos cromatográficos. Asimismo, se propone realizar hidrolizados de cada una de las fracciones de los orujos, es decir, de semillas y hollejos; así como su caracterización y análisis de funcionalidad.

Por otro lado, se observó que los hidrolizados estimulan principalmente la germinación de las semillas de lechuga y rábano. De esta forma se recomienda seguir un tratamiento enfocado a estudios en invernadero aplicando diferentes tratamientos de los hidrolizados de residuos vinícolas.

Por otra parte, se observó que los hidrolizados presentaron actividad fúngica frente a *F. oxysporum*, *Alternaria* spp y *Botrytis* spp. Por lo tanto, se propone realizar estudios para conocer los mecanismos de acción de los hidrolizados para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos. Es importante conocer si el daño es a nivel estructural (de membrana), o a un nivel de inhibición de síntesis de proteínas funcionales para el crecimiento del hongo. Así como realizar estudios a nivel de invernadero y campo para evaluar las dosis y nivel de control de los hongos fitopatógenos, al aplicar los hidrolizados de orujo de vino tinto, rosado y blanco.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Ros-García, J.M. 2015. Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. *Food Chemistry*, 187:89-97.
- Agustin-Salazar, S., Medina-Juárez, L.A., Soto-Valdez, H., Manzanares-López, F., Gámez-Meza, N. 2014. Influence of the solvent system on the composition of phenolic substances and antioxidant capacity of extracts of grape (*Vitis vinifera* L.) marc. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20: 208-213.
- Badet, C. 2011. Antibacterial activity of grape (*Vitis vinifera*, *Vitis rotundifolia*) seeds. In nuts and seeds in health and disease prevention; Preedy, V. R., Watson, R. R., Patel, V. B., Eds., Academic Press: London, UK. pp 545-552.
- Botella, C. 2005. Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical Engineering Journal*, 26: 100-106.
- Cabello-Pasini, A., Macias-Carranza, V., Mejía-Trejo, A. 2017. Efecto del mesoclima en la maduración de uva Nebbiolo (*Vitis vinifera*) en el Valle de Guadalupe, Baja California, México. *Agrociencias*, 5 (6): 617-633.
- Campos, L. M. A. S., Leimann, F. V., Pedrosa, R. C., Ferreira, S. R. S. 2008. Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresource Technology*, 99: 8413-8420.
- Carvalho, F., Duarte, L., Girio, F. 2008. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 67: 849-864.

- Carrau, F., Medina, K., Pérez, G., Gaggero, C., Barquet, M., Urruty, M., Disegna, E., Coniberti, A., Ferrari, V., Martin, V., Canoura, C., Medina, M., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E. 2012. *Vitis Vinifera Tannar*, el resultado de un trabajo de investigación multidisciplinario. *Revista Digital Universitaria*, 13 (5): 1-17.
- Cavazos-Pérez, M.T. 2012. Situación actual y bajo escenarios de cambio climático de la industria vitivinícola de Baja California, México. CICESE.
- Chaparro-Mercado, M.C., Armenta, E.G., Cornejo-Mazón, M., Pedroza-López, R., Gutiérrez-López, G.F. 2014. Nutraceutical and functional properties of grape seeds. In: *Seeds as Functional Foods and Nutraceuticals: New Frontiers in Food Science*, pp. 235-246.
- CONACYT. 2017. Ciclo de lluvias 2017/2018 en Ensenada: el más seco desde mediados del siglo pasado, consultado el 8 de enero del 2019. <http://www.conacytprensa.mx/index.php/centrosconacyt/boletinescentros/21498-ciclo-de-lluvias-2017-2018-en-ensenada-el-mas-seco-desde-mediadosdel-siglo-pasado>
- Delgado-Adámez, J., Gamero-Samino, E., Valdés-Sánchez, E., González-Gómez, D. 2012. In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24, 136-141.
- Del toro Kobzeff, Anabel. 2015. Tesis: Caracterización y análisis comparativo de la salinidad de suelos de cultivo de importancia económica de la región de Ensenada, B.C. y zona vitícola de Caborca, Son. CICESE. pp. 1-159.

- Domínguez, E, Romaní, A., Alonso, J.L., Parajó, J.C., Yáñez, R. 2014. A biorefinery approach based on fractionation with a cheap industrial by-product for getting value from an invasive woody species. *Bioresource Technology*, 173: 301-308.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Biochemistry*, 28: 350-356.
- Fabbri, A., Bonifazi, G., Serranti, S. 2015. Micro-scale energy valorization of grape marcs in winery production plants. *Waste Management* 36:156-165.
- Friedman, M. 2014. Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines and winery byproducts in relation to their flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 6025-6042.
- Garcia-Becerra, L, Mitjans, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cardenas, A., Maria, PV. 2016. Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry*, 1081-1088.
- Garriz, Andoni. 2011. Divulgación: La Química del vino. Para celebrar el Año Internacional de la Química. *Educación química*, 22(4): 282-287.
- Grande Tovar, C. D. 2016. Valoración biotecnológica de residuos agrícolas y agroindustriales. Colombia: Editorial Bonaventuriana. pp. 180.
- Guy, H., Pahun, Jeann, Trigo, E. 2014. La Bioeconomía en América Latina: oportunidades de desarrollo e implicaciones de política e investigación. *FACES*, 20: 125-141.

- International Organisation of Vine and Wine (OIV). 2018. OIV Statistical Report on World Vitiviniculture. pp.27.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., Sakariah, K. K. 2003. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36, 117-122.
- Katalinic, V., Možina, S. S., Skroza, D., Generalic, I., Abramovic, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P., Boban, M. 2010. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food Chemistry*, 119: 715-723.
- Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A.G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71: 214-222.
- Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P. 2001. Antioxidant capacities and phenolics levels of French wines from different varieties and vintages. *Journal of Afro-cultural and Food Chemistry*, 49: 3341-3348.
- López, V., Sotelo, C. 2014. Los vinos del Valle de Guadalupe: Análisis de su comercialización. *European Scientific Journal*, 10 (4): 90-106.
- Makris, D. P., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. 2007. Polyphenolic content and *in vitro* antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 125-132.

- Meraz-Ruiz, L. y Wise-Lozano, J. A. 2018. Capítulo 2: El sector vitivinícola de Baja California: un estudio de su competitividad. Agronegocios en México: Competitividad y desafíos. Editorial Qartuppi.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Mosier, N., Hendrickson, R., Hoa, N., Sedlak, M., Ladisch, M.R. 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, 96: 1986-1993.
- Oliveira, J., Alinho Da Silva, M., Teixeira, N., De Freitas, V., Salas, E. 2015. Screening of Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Pigments in Red Wine Grape Pomace Using LC-DAD/MS and MALDI-TOF Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63:7636-7644.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., Gómez-Plaza, E. 2006. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563: 26-32.
- Pedreschi, R., Cisneros-Zevallos, L. 2006. Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4557-4567.
- Peixoto, C.M., Diasa, M.I., Alvesa, M.J., Calhelhaa, R.C., Barrosa, L., Pinhob, S.P., Ferreira, I. 2018. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry* 253: 132-138.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, S. 2006. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science y Technology*, 579-590.

- Quiñonez-Ramírez, J.J., Bringas-Rábago, N. L., Barrios-Prieto, C. 2012. La Ruta del Vino en Baja California, Cuaderno 18, pp. 131, CONACULTA, México, D.F.
- Rodríguez-Vaquero, M. J., Aredes-Fernández, P. A., Manca De Nadra, M. C., Strasser De Saad, A. M. 2013. Effect of phenolic compounds from Argentinean red wines on pathogenic bacteria in a meat model system. *Journal of Food Biochemistry*, 37: 425-431.
- Rosas, D., Ortiz, H. 2016. Revalorización de algunos residuos agroindustriales y su potencial de aplicación a suelos agrícolas. *Facultad de Ciencias Básicas*, (9): 18-23.
- Sánchez, A., Ysunza, F., Beltran-García, M.J., Esqueda, M. 2002. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2537-2542.
- Sánchez, Z. L. 2006. La industria vitivinícola. Estudios Económicos de Baja California. Universidad Autónoma de Baja California, 161-179.
- Saval, S. 2012. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. *Biotecnología*, 16: 14-46.
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). 2018. <https://www.gob.mx/sader/es/articulos/disfruta-del-vino-mexicano-en-tinto-mx-2018?idiom=es>
- Sun, Y., Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83: 1-11.
- Taherzadeh, M., Karimi, K. 2007. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, 2: 472-499.

- Thring, R., Chornet, E., Overend, R. 1990. Recovery of a solvolytic lignin: effects of spent liquor/acid volume ration, acid concentration and temperatur. *Biomass*, 23: 289-305.
- Tzintzun-Camacho, O., Sánchez-Segura, L., Minchaca-Acosta, A.Z., Rosales-Colunga, L.M., Hernández-Orihuela, A., Martínez-Antonio, A. 2016. Development of bacterial culture medium from avocado seed waste. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15, (3): 831-842.
- Van Leeuw, R., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommès, J. 2014. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. *Journal of Food Composition and Analysis* 36: 40-50.
- Vargas Corredor, Y. A., Pérez Pérez, L. I. 2018. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 14: 1-14.
- Vaz, M., Hogg, T., Couto, J. A. 2010. The antimicrobial effect of wine on *Bacillus cereus* in simulated gastro-intestinal conditions. *Food Control*, 28: 230-236.
- Velázquez-Córdoba, A. 2017. Tierra de Vino. Consultado el 9 de enero 2019. <https://www.elvigia.net/columnas/mirada-mujer/2017/6/29/tierra-vino275637.html>
- Xia, E., Deng, G., Guo, Y., Li, H. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, 11: 622-646.
- Yu, J., Ahmedna, M. 2013. Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science & Technology*, 48: 221-237.

Zárate Aquino, Margarita Araceli. 2014. Manual de hidroponía. Instituto de Biología. www.ibiología.unam.mx.